

AUS DEM INSTITUT FÜR INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND
KRANKENHAUSHYGIENE DES FACHBEREICHS MEDIZIN DER
PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. M. LOHOFF

Molekulare Quantifizierung der mCMV-Immunevasion

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanbiologie
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von

Niels Arne Wilhelm Lemmermann

aus Berlin-Wilmersdorf

Marburg, im Februar 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.06.2009
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Klaus Heeg

1. Korreferent: Prof. Dr. Michael Lohoff

Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton, 1643-1727

Zusammenfassung

Die Kontrolle der murinen Cytomegalovirus (mCMV)-Infektion wird vom Organismus der Maus primär durch antivirale CD8 T-Zellen vermittelt. Diese erkennen auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte virale Peptide und lysieren die infizierte Zelle. Um der Immunkontrolle zu entkommen, entwickelte mCMV im Laufe der Evolution der Virus-Wirtbeziehung Strategien der Immunevasion, die direkt die Expression der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche beeinflussen. Die hierfür verantwortlichen Early (E)-Glykoproteine m06/gp48 und m152/gp40 werden auf Grund ihres regulatorischen Einflusses auf die Antigenpräsentation als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bezeichnet. Die vRAPs interferieren mit dem Transport Peptid-beladener MHC-Klasse-I-Moleküle und reduzieren in ihrer kooperativen Wirkung die Präsentation viraler Peptide an der Zelloberfläche, mit der Folge, dass die Erkennung infizierter Zellen inhibiert wird.

Bisherige funktionelle Untersuchungen zeigten die qualitative Verringerung der MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche nach Expression der vRAPs und wiesen auf eine differentielle Wirkung der vRAPs auf die Gesamtpopulation der MHC-Klasse-I-Moleküle im Vergleich zu den Peptid-MHC-Klasse-I Komplexen hin.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Effizienz und Spezifität der von mCMV vermittelten CD8 T-Zell-Immunevasion näher untersucht werden. Hierfür war es notwendig ein Modell zu etablieren, das es ermöglichte, selektiv die Präsentation eines viral kodierten Peptids auf der Zelloberfläche zu quantifizieren. Ziel war es, zwischen der Gesamtheit an MHC-Klasse-I-Molekülen eines bestimmten Allels und denjenigen, die ein definiertes virales Peptid präsentieren, unterscheiden zu können. Um dieses zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit der monoklonale Antikörper T-AG25-DL1.16 eingesetzt, der selektiv den Präsentationskomplex aus dem MHC-Klasse-I-Molekül K^b und dem gut charakterisierten Modell-Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) aus dem Ovalbumin (OVA) nachweist. Um SIINFEKL im System der mCMV-Infektion nutzbar zu machen, wurden mittels BAC-Mutagenese die mCMV-Rekombinanten mCMV-vRAP-SIINFEKL und mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL generiert. In diesen Viren wurde mittels „orthotopen Peptidaustauschs“ im E-Protein m164/gp36,5 das immundominante virale Peptid m164₁₅₀₋₁₅₈ gegen SIINFEKL ausgetauscht.

Wie gezeigt werden konnte wird SIINFEKL nach Infektion von Fibroblasten prozessiert und von den vRAPs wie ein mCMV-Peptid kontrolliert. Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit beiden Rekombinanten führt zum SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zell *Priming* in der Akut- und *Memory*-Phase der Infektion. In einer Analyse der CD8 T-Zell-Frequenzen ord-

net sich SIINFEKL in einer intermediären Position des Spektrums der authentischen mCMV-Peptide ein.

Die erfolgreiche Integration von SIINFEKL in das virale Immunom erlaubte zum ersten Mal die absolute Quantifizierung der Effektivität der viralen Immunevasion. Dabei ergab sich, dass die vRAPs die Präsentation von K^b -SIINFEKL um einen Faktor von > 100 reduzieren, während die Expression aller K^b -Moleküle an der Zelloberfläche nur um einen Faktor von ~ 4 reduziert wird. Dies belegt den starken Einfluss der vRAPs auf die Präsentation der endogen mit viralen Peptiden beladenen MHC-Klasse-I Moleküle im Vergleich zur Gesamtpopulation der Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche. In weiteren Experimenten der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine endogene Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle mit SIINFEKL im ER deutlich effizienter ist als ihre exogene Beladung mit synthetischem Peptid an der Zelloberfläche.

Summary

The infection with murine Cytomegalovirus (mCMV) is primarily controlled by virus-specific CD8 T cells. These cells recognize viral peptides presented by MHC-class I molecules and lyse the infected cell. In order to subvert immune control by CD8 T cells, mCMV has developed strategies of immune evasion during virus-host co-evolution. mCMV encodes two negative viral regulators of antigen presentation (vRAPs), the Early (E)-phase proteins m152/gp40 and m06/gp48, which interfere with antigen presentation in the MHC class I pathway. The vRAPs obstruct the transport of peptide-loaded MHC molecules to the cell surface and downmodulate MHC class I surface expression in a cooperative effect. As a consequence, the recognition of infected cells by CD8 T cells is inhibited. Previous functional studies demonstrated the qualitative reduction of MHC class I surface presentation by the vRAPs and indicated differential vRAP effects on total cell surface class I and peptide-loaded cell surface class I.

So far, the differential effects of mCMV vRAPs could not be quantitated because there exists no antibody to distinguish between all molecules of a certain MHC class-I allele and those presenting a defined mCMV peptide. However, T-AG25-DL1.16 is the prototype of an antibody that can recognize a presentation complex of class I and bound peptide, namely the presentation complex formed between K^b and the ovalbumin (OVA)-derived peptide SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄). For studying efficacy and specificity of mCMV immune evasion using T-AG25-DL1.16, the SIINFEKL-coding sequence was integrated into the viral genome by BAC mutagenesis for an “orthotopic peptide swap” replacing the dominant m164₁₅₀₋₁₅₈ epitope of the mCMV protein m164/gp37.5 with SIINFEKL.

The corresponding recombinant viruses mCMV-vRAP-SIINFEKL and mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL were found to process SIINFEKL in infected fibroblasts, and vRAPs controlled its presentation just like that of an authentic viral peptide. Both viruses were found to prime an acute and memory CD8 T cell response in which the “transantigen” SIINFEKL took an intermediate position in the immunodominance hierarchy of the authentic mCMV peptides. The successful integration of SIINFEKL allowed for the first time a quantitation of viral immune evasion in terms of absolute numbers. vRAP expression was shown to reduce K^b-SIINFEKL complexes on the cell surface by a factor of > 100, whereas the downmodulation of total cell surface K^b was only ~4-fold. Further experiments demonstrated that in the absence of vRAPs endogenous SIINFEKL presentation in infected cells is superior to an exogenous loading of MHC class I molecules with synthetic peptide.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren	2
1.2.1 Virionstruktur	2
1.2.2 Genomstruktur.....	3
1.2.3 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese.....	4
1.2.3.1 Penetration der Wirtszelle.....	4
1.2.3.2 CMV-Genexpression.....	5
1.2.3.3 CMV-Replikation und Virion Morphogenese.....	5
1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion.....	6
1.3.1 Epidemiologie.....	6
1.3.2 Symptomatik der CMV-Infektion.....	7
1.3.3 Therapeutische Ansätze und Vakzinierung	8
1.4 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion	9
1.5 Immunkontrolle der CMV-Infektion.....	10
1.5.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems gegen CMV	10
1.5.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems gegen CMV	11
1.6 Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I.....	13
1.6.1 MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex.....	13
1.6.2 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg.....	14
1.6.3 Immunevasion der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenpräsentation durch mCMV.....	16
1.7 SIINFEKL als Modellpeptid der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	18
1.8 Der mCMV ORF m164 und das von ihm kodierte Protein m164/gp36,5	20
1.9 Zielsetzung.....	22
2 Material	23
2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien.....	23
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte	23
2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	25

2.1.3	Chemikalien.....	27
2.1.4	Kits.....	29
2.1.5	Enzyme.....	30
2.1.6	Oligonukleotide.....	30
2.1.7	Antigene Peptide	32
2.1.8	Antikörper	33
2.2	Viren	34
2.3	Bakterien.....	35
2.4	Versuchstiere	35
2.5	Materialien für die Zellkultur	35
2.5.1	Reagenzien und Medienzusätze	35
2.5.2	Zytokine.....	37
2.5.3	Zellkulturmedien	38
2.5.4	Primäre Zellen und Zelllinien	39
3	Methoden.....	40
3.1	Zellbiologische Methoden	40
3.1.1	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	40
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	41
3.1.3	Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten.....	41
3.1.4	Transfektion von BAC-Plasmid-DNA.....	42
3.1.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	42
3.2	Virologische Methoden.....	43
3.2.1	mCMV-Produktion	43
3.2.2	mCMV-Virustiter Bestimmung	44
3.2.2.1	Virustiter-Bestimmung aus Überständen	44
3.2.2.2	Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten.....	45
3.2.3	Zentrifugale Infektion von MEF.....	45
3.2.4	Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV.....	46
3.3	Tierexperimentelle Methoden.....	47
3.3.1	Intraplantare Infektion der C57BL/6 Maus.....	47
3.3.2	Immunsuppression	47
3.3.3	Organentnahme und Probenkonservierung	47
3.4	Biochemische Methoden.....	48
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.4.2	Western Blot.....	49
3.4.3	Immunfärbung des Western Blot-Signals	50
3.4.4	Proteinquantifizierung.....	51

3.5 Molekularbiologische Methoden.....	51
3.5.1 Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben.....	51
3.5.2 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren	52
3.5.3 Native Gelelektrophorese von DNA.....	52
3.5.4 Elution von DNA aus Agarose-Gelen	53
3.5.5 Reinigung von DNA.....	54
3.5.6 Dephosphorylierung linearer DNA.....	54
3.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten	54
3.5.8 Bakterienanzucht.....	55
3.5.8.1 Flüssigkulturen.....	55
3.5.8.2 Plattenkulturen	56
3.5.8.3 Dauerkulturen	56
3.5.9 Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	56
3.5.9.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	56
3.5.9.2 Elektrotransformation.....	57
3.5.9.3 Elektrotransformation von BAC-Plasmiden.....	57
3.5.10 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	58
3.5.10.1 Präzipitation von Nukleinsäuren	58
3.5.10.2 DNA Isolierung aus Virusüberständen.....	59
3.5.10.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	59
3.5.10.4 Schnellpräparation von BAC-Plasmiden.....	60
3.5.10.5 QIAprep Spin Miniprep.....	61
3.5.10.6 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation	61
3.5.10.7 BAC-Plasmid Maxipräparation.....	62
3.5.11 Polymerase Kettenreaktion	62
3.5.11.1 PCR für Klonierungszwecke	63
3.5.11.2 Mutagenese durch Kombinations-PCR.....	65
3.5.11.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	66
3.5.11.4 Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung.....	66
3.5.11.5 <i>TaqMan</i> qPCR	67
3.5.12 Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC (<i>Bacterial Artificial</i> <i>Chromosome</i>)-Technologie	68
3.5.12.1 Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren im <i>E. coli</i> Stamm DH10B	68
3.6 Immunologische Methoden.....	71
3.6.1 Gewinnung von Zellen aus der Milz	71
3.6.2 MACS Separation.....	71
3.6.2.1 Anreicherung von CD8 T-Lymphozyten mit Hilfe des autoMACS.....	72

3.6.3	Anlage und Restimulation von zytolytischen T-Zellen	72
3.6.4	Zielzellen für mCMV-spezifische Effektor-CTL	73
3.6.4.1	mCMV-infizierte Zielzellen	73
3.6.4.2	Exogen beladene Zielzellen	74
3.6.5	<i>ELISpot</i> (<i>Enzyme linked immuno spot</i>)-Assay	74
3.6.5.1	Frequenzauswertung des <i>ELISpot</i> -Assay	76
3.6.6	Zytolysetest ($[^{51}\text{Cr}]$ -Release-Assay)	77
3.6.7	Zytofluorometrische Analysen	78
3.6.7.1	Funktionsprinzipien des Zytofluorometers und Datenakquisition	78
3.6.7.2	Zellmarkierungen	79
3.6.7.2.1	<i>Oberflächenmarkierung</i>	80
3.6.7.2.2	<i>Intrazellulärmarkierung</i>	80
3.6.7.3	Quantifizierung von Oberflächenantigenen	81
3.7	Histologie	82
3.7.1	Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen	82
3.7.1.1	Dehydratisierung und Paraffineinbettung der Gewebestücke	82
3.7.1.2	Anfertigung von Gewebeschnitten	83
3.7.1.3	Deparaffinierung und Rehydratisierung	83
3.7.2	mCMV-IE1-Immunhistochemie	83
4	Ergebnisse	86
4.1	Strategie zur Herstellung von mCMV-Rekombinanten mit orthotopem Austausch antigenen Peptide	86
4.2	Vorhersage der Peptid Generierung und MHC-Klasse-I-Bindung	88
4.3	Generierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide durch Zwei-Schritt-Rekombination in <i>E. coli</i>	90
4.3.1	Klonierung des <i>Shuttle</i> -Vektors pST76-m164-SIINFEKL	93
4.3.2	Klonierung des <i>Shuttle</i> -Vektors pST76-m164-SIINFEKA	94
4.3.3	Charakterisierung der rekombinanten <i>Shuttle</i> -Plasmide	95
4.4	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide	97
4.4.1	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-SIINFEKL-Plasmide	97
4.4.2	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-SIINFEKA-Plasmide	98
4.4.3	Molekulare Charakterisierung der hergestellten mCMV-BAC-Plasmide	98
4.4.3.1	Restriktionsanalyse	98
4.4.3.2	Analyse des orthotopen Peptidaustausches	99
4.4.4	Herstellung rekombinanter mCMV aus mCMV-BAC-Plasmid-DNA	102
4.4.5	Exzision der BAC-Sequenzen	103

4.5	Etablierung einer quantitativen <i>Real-Time</i> -PCR zur Bestimmung von BAC-Sequenzen	104
4.5.1	Konstruktion eines Plasmid-Standards.....	104
4.5.2	qPCR zur absoluten Quantifizierung von BAC-Sequenzen.....	105
4.5.3	Quantifizierung von BAC-Sequenzen aus Überständen rekonstituierter mCMV-Rekombinanten	107
4.5.4	Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses	108
4.6	Charakterisierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten	109
4.6.1	Expressionskinetik des Proteins m164/gp36,5-SIINFEKL.....	110
4.6.2	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse der intrazellulären m164/gp36,5-Expression.....	111
4.6.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung von mCMV-Rekombinanten.....	112
4.6.3.1	Vergleich der Virusreplikation in Milz und Lunge durch Plaque-Assay	113
4.6.3.2	Nachweis der Virusreplikation in der Leber durch IE1-spezifische Immunhistologie.....	114
4.7	Immunologische Charakterisierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten	116
4.7.1	Nachweis der Immunogenität der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten	116
4.7.1.1	<i>Priming</i> von mCMV-Peptid-spezifischen T-Zellen	116
4.7.1.2	Einordnung der SIINFEKL-Spezifität in das <i>Priming</i> Profil der mCMV-Infektion	117
4.7.2	Generierung und Charakterisierung einer SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Linie.....	120
4.7.3	Erkennung infizierter MEF durch CTLL	122
4.8	Zytofluorometrische Analysen der SIINFEKL-Präsentation	125
4.8.1	Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I auf C57BL/6 MEF	125
4.8.2	Testung des mAb T-AD 25.D1.16 auf exogen mit SIINFEKL beladenen C57BL/6 MEF	126
4.8.3	SIINFEKL-Präsentation auf der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF ..	127
4.8.4	Vergleich der SIINFEKL-Präsentation auf endogen und exogen beladenen C57BL/6 MEF	130
4.9	Zytofluorometrische Quantifizierung der Präsentation von MHC-Klasse-I präsentierten Peptiden	132
4.9.1	Die Methoden der zytofluorometrischen Quantifizierung.....	133
4.9.1.1	Quantifizierungen von Zelloberflächenantigenen mit Hilfe des QIFIKIT	134

4.9.2	Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die Gesamt-MHC-Klasse-I-Expression.....	136
4.9.3	Quantifizierung der SIINFEKL-Präsentation.....	140
4.9.4	Quantifizierung der SIINFEKL Präsentation nach exogener Belastung.....	142
5	Diskussion.....	145
5.1	Diskussion der Ergebnisse.....	145
5.2	Fazit und Ausblick	158
6	Literaturverzeichnis	160
7	Anhang.....	184

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur eines HCMV-Virions	3
Abb. 2: <i>Primary and secondary envelopment</i> während der Virion-Morphogenese	6
Abb. 3: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweges...	16
Abb. 4: Funktionen der Immunevasine/vRAPs des mCMV	18
Abb. 5: Modell der Interaktion von SIINFEKL mit H2-K ^b	19
Abb. 6: Schematische Darstellung des Proteins m164/gp36,5	21
Abb. 7: Schematische Darstellung einer Kombinations-PCR zur gerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen.	65
Abb. 8: Schema der Zwei-Schritt-mCMV-BAC-Mutagenese in <i>E. coli</i>	70
Abb. 9: Orthotoper Peptidaustausch des D ^d restringierten Peptides m164 ₁₅₀₋₁₅₈ durch das K ^b präsentierte Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ bzw. OVA _{257-264L→A}	87
Abb. 10: Vergleich des proteasomalen C-terminalen Schnitts von m164/gp36,5-SIINFEKL und m164/gp36,5-SIINFEKA	89
Abb. 11: Schematische Darstellung des <i>Shuttle</i> -Vektors pST76K_SR.....	90
Abb. 12: Schema der Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Zwei-Schritt-Rekombination (verändert nach C. Simon).....	92
Abb. 13: Konstruktion rekombinanter <i>Shuttle</i> -Plasmide.....	94
Abb. 14: Auftrennung der generierten <i>Shuttle</i> -Plasmide nach Restriktionsverdau.	96
Abb. 15: Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in <i>E. coli</i>	99
Abb. 16: Auftrennung von <i>Apal</i> restringierten PCR-Fragmenten	100
Abb. 17: Chromatogramme der Sequenzierungen von mCMV-vRAP, mCMV-vRAP-SIINFEKL, und mCMV-vRAP-SIINFEKA.	101
Abb. 18: Übersicht der generierten rekombinanten BAC-Plasmide	102
Abb. 19: Schematische Darstellung des Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_BAC	105
Abb. 20: Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen mit <i>TaqMan</i> -Sonden	106
Abb. 21: Kinetik der Expression von m164/gp36,5	110
Abb. 22: Lokalisation des m164-Proteins in infizierten MEF	111
Abb. 23: <i>In vivo</i> Replikation von mCMV-vRAP-SIINFEKL im Vergleich zu mCMV-vRAP	113
Abb. 24: Immunhistologischer Nachweis der <i>in vivo</i> -Replikation der mCMV-vRAP-SIINFEKL-Rekombinanten im Vergleich zu mCMV-vRAP.....	114
Abb. 25: Kinetik der <i>in vivo</i> -Replikation von mCMV-vRAP-SIINFEKL im Vergleich zu mCMV-vRAP.....	115
Abb. 26: Funktionelle Verifizierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten	117

Abb. 27: Vergleich des CD8 T Zell-Repertoires in der Akut- und Memory-Phase der Infektion	118
Abb. 28: Kinetik des SIINFEKL-spezifischen <i>Primings</i>	119
Abb. 29: Zytolytische Aktivität SIINFEKL- und m139-spezifischer CD8 T-Zellen.....	121
Abb. 30: Nachweis der Erkennung von exogen beladenen MEF durch SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen.....	122
Abb. 31: IFN γ -Sekretion Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen nach Stimulation durch infizierte C57BL/6 MEF	123
Abb. 32: Erkennung und Lyse von infizierten C57BL/6 MEF durch Peptid-spezifische CTLL.....	124
Abb. 33: Histogramm der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf C57BL/6 MEF	126
Abb. 34: Spezifische Erkennung von SIINFEKL-K ^b -Komplexen durch den mAb T-AD 25.D1.16 nach exogener Beladung von C57BL/6 MEF	127
Abb. 35: Histogramm des Einflusses von IFN γ auf die Präsentation von SIINFEKL-K ^b -Komplexen nach Infektion mit rekombinanten mCMV	128
Abb. 36: Nachweis von SIINFEKL-K ^b Komplexen auf der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF	129
Abb. 37: Nachweis von endogen und exogen mit SIINFEKL beladenen MHC-Klasse-I K ^b -Molekülen.....	131
Abb. 38: Schematische Darstellung der QIFIKIT- <i>Beads</i>	134
Abb. 39: Histogramme der „ <i>Set-up</i> “- <i>Beads</i> und Kalibrations- <i>Beads</i> des QIFIKIT	135
Abb. 40: Histogramm einer Messung von Kalibrations- <i>Beads</i> und Darstellung der ermittelten Regressionsgerade	136
Abb. 41: K ^b -Expression auf der Oberfläche infizierter MEF	138
Abb. 42: Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die Zelloberflächenexpression von K ^b - auf C57BL/6 MEF	139
Abb. 43: Quantifizierung der K ^b -SIINFEKL-Komplexe an der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF	140
Abb. 44: Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die K ^b -SIINFEKL-Präsentation	142
Abb. 45: Quantifizierung der exogenen Beladung von MEF nach mCMV-Infektion....	144

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierung human- und tierpathogener Herpesviren	1
Tab. 2: Liste der verwendeten antigenen Peptide	32
Tab. 3: Liste der verwendeten Antikörper	33
Tab. 4: Zusammensetzung des 4% Sammelgels und des 10% Trenngels.....	48
Tab. 5: Mittels NetMHC3.0 vorhergesagte Bindungseigenschaften der Peptide SIINFEKL und SIINFEKA an H2-K ^b	88
Tab. 6: Mittels RANKPEP vorhergesagte Bindungen der Peptide SIINFEKL und SIINFEKA an H2-K ^b	89
Tab. 7: Auflistung der Kombinations-PCRs zur Herstellung der <i>Shuttle</i> -Plasmide	93
Tab. 8: Restriktions-Analyse der klonierten m164- <i>Shuttle</i> -Plasmide	95
Tab. 9: Übersicht der generierten m164-SIINFEKL-BAC-Plasmide	97
Tab. 10: Übersicht der generierten m164-SIINFEKA-BAC-Plasmide	98
Tab. 11: Ergebnisse zur Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC-Techno- logie	103
Tab. 12: Virustiter der generierten BAC-freien mCMV-Rekombinanten.	104
Tab. 13: Quantifizierung der BAC-Sequenz in Überständen rekonstituierter mCMV- Rekombinanten.....	107
Tab. 14: Bestimmung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse der generierten mCMV- Rekombinanten.....	109
Tab. 15: Absolute Quantifizierung der K ^b -Moleküle an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit mCMV-Rekombinanten.....	184
Tab. 16: Absolute Quantifizierung der mit SIINFEKL beladenen K ^b -Molekülen an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit mCMV-Rekombi- nanten	185
Tab. 17: Absolute Quantifizierung von SIINFEKL beladenen K ^b -Molekülen an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach exogener Beladung mit syntheti- schem Peptid	186
Tab. 18: Berechnung des Prozentsatzes endogen mit SIINFEKL beladener K ^b - Moleküle an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit rekombi- nantem mCMV	186

1 Einleitung

1.1 Taxonomie

Die Cytomegaloviren (CMVs) werden nach der Klassifikation des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (Roizman et al., 1981) der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet. Die Wortbedeutung „Herpes“ leitet sich von der „kriechenden“, latein. *herpes*, griech. ἑρπεῖν, Ausbreitung des Hautausschlags der humanen *Herpes simplex* Infektion ab.

In die ubiquitär verbreitete Familie der *Herpesviridae* werden mehr als 200 beschriebene Spezies, davon acht humanpathogene Vertreter, eingeordnet (zur Übersicht siehe Tab. 1). Die Zuordnung zur Familie der *Herpesviridae* erfolgt in der Regel anhand der Viruspartikel-Architektur (Plummer, 1967). Als Besonderheit ist allen Herpesviren die Fähigkeit zur Etablierung von Latenz gemein, d.h. nach einer Primärinfektion verbleiben virale Genome ruhend im Organismus. Unter Immunsuppression können sie transkriptionell reaktivieren und eine produktive Infektion induzieren (Roizman & Baines, 1991; Reddehase et al., 2008).

Tab. 1: Klassifizierung human- und tierpathogener Herpesviren

Unterfamilie	Genus	Humanpathogene Vertreter	Tierpathogene Vertreter	Referenz
<i>α-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	HHV1 Herpes-Simplex-Virus 1	<i>Bovine herpesvirus 2</i>	Grueter, 1924
		HHV2 Herpes-Simplex-Virus 2	<i>Cercopithecine herpesvirus 1</i>	Schneweis, 1962
	Varicellovirus	HHV3 Varizella-Zoster-Virus	<i>Suid herpesvirus 1</i> (Pseudorabiesvirus)	Dumas et al., 1980
<i>β-Herpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	HHV5 Humanes Cytomegalovirus	<i>Pongine herpesvirus 4</i> (Pongines Cytomegalovirus)	Smith, 1956
	Muromegalovirus		<i>Murid herpesvirus 1</i> (Murines Cytomegalovirus)	Smith, 1954
	Roseolovirus	HHV-6 HHV-7		Lindquester & Pellett, 1991 Frenkel et al., 1990
<i>γ-Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	HHV4 Epstein-Barr-Virus	<i>Pongine herpesvirus 1</i>	Epstein et al., 1965
	Rhadinovirus	HHV8 Kaposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	<i>Saimiriine herpesvirus 2</i>	Chang et al., 1994

(verändert nach van Regenmortel et al., 2000) Referenzen sind für die humanpathogenen Vertreter sowie das murine Cytomegalovirus angegeben, für die tierpathogenen Herpesviren vergleiche Roizman et al. (1981).

Die *Herpesviridae* werden entsprechend ihrer biologischen Eigenschaften, wie Wirtsspektrum, Dauer des Replikationszyklus sowie der Zytopathologie und dem Ort ihrer Persistenz, in die drei Subfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt (Roizman et al., 1992).

Die α -*Herpesvirinae* besitzen ein breites Wirtsspektrum sowie einen kurzen Replikationszyklus. *In vivo* sind sie neurotrop und etablieren Latenz in sensorischen Ganglien, wie dem *Ganglion trigeminale* oder dem *Ganglion sacrale*.

Die β -*Herpesvirinae* zeigen hingegen eine strikte Speziespezifität sowie einen langsamen Replikationszyklus.

Auch die γ -*Herpesvirinae* besitzen ein limitiertes Wirtsspektrum. Sie infizieren und etablieren ihre Latenz vorwiegend B- und T-Lymphozyten. (Pellett & Roizman, 2007).

1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren (*human*: HCMV; *murin*: mCMV) sind große DNA-Viren der Unterfamilie der β -*Herpesvirinae*. Namensgebend für die Cytomegaloviren war die typische Vergrößerung (griech. $\mu\epsilon\gamma\alpha\lambda\omicron\varsigma$; riesig) der infizierten Zellen (Weller et al., 1960).

1.2.1 Virionstruktur

Die Virionen der Cytomegaloviren (siehe Abb. 1) zeigen die typische Morphologie eines Mitglieds der *Herpesviridae*. Die reifen Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200nm und weisen in ihrem Inneren eine elektronendichte Strukturkomponente (*core*) auf. Diese besteht aus dem mit fibrillären Proteinen komplexierten, linearen, doppelsträngigen DNA-Genom. Der DNA-Protein-Komplex mit einem Durchmesser von etwa 75nm wird von dem ikosaedrischen Nukleokapsid (\otimes ~100nm) umschlossen. Es setzt sich aus 162 Kapsomeren zusammen (Chen et al., 1999) und ist von einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument, bestehend aus ca. 25 verschiedenen viralen Proteinen, umgeben. Nach außen ist das Virion durch eine etwa 11nm dicke Lipid-Doppelschicht (*envelope*) zellulären Ursprungs (Tooze et al., 1993), in die virale und zelluläre Glykoproteine eingelagert sind (Streblow et al., 2006; Mocarski et al., 2007), begrenzt. Die viralen Glykoproteine vermitteln das virale *Attachment* an der Wirtszelle sowie die Penetration durch pH-unabhängige Membranfusion (Compton et al., 1992). Arbeiten in der Gruppe von C. Sinzger lassen vermuten, dass es zumindest in Endothelzellen neben der direkten Fusion noch weitere Wege der Partikel-Aufnahme gibt (Sinzger, 2008).

Neben infektiösen Virionen mit einem vollständigen Genom in ihrem Nukleokapsid bildet HCMV *in vitro* auch nicht-infektiöse umhüllte Partikel (*non-infectious enveloped particles*, NIEPs) und so genannte *dense bodies* (DBs), gleichfalls nicht-infektiöse umhüllte Partikel, die vorwiegend aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen (Sarov & Abady, 1975; Irmieri & Gibson, 1983). Beide Partikel besitzen eine dem Virion entsprechende Hüllmembran und sind ebenfalls fusionsaktiv. Demgegenüber bilden mCMV-infizierte Zellen keine DBs, können aber Multikapsid-Virionen mit einem Durchmesser von bis zu 600nm formen (Chong & Mims, 1981; Weiland et al., 1986).

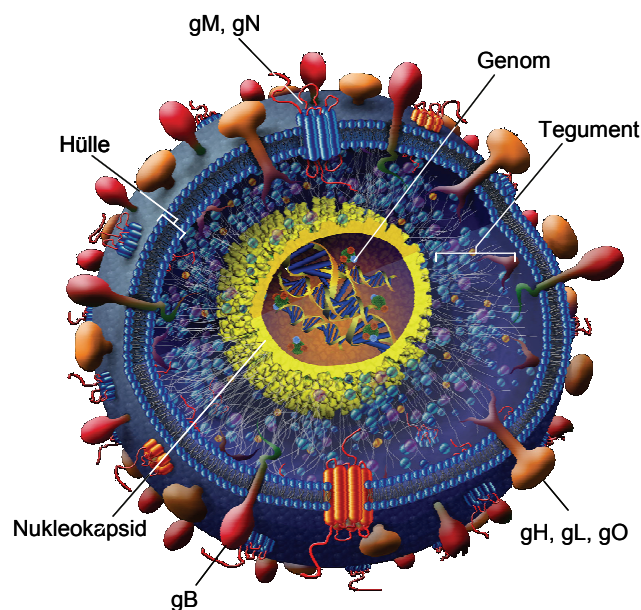


Abb. 1: Struktur eines HCMV-Virions

Typische dreischichtige Struktur des HCMV-Virions, bestehend aus Lipidhülle, Tegument und Nukleokapsid. Die Lipidhülle enthält eine Vielzahl viraler Glykoproteine (verändert nach Streblow et al., 2006).

1.2.2 Genomstruktur

Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom der Cytomegaloviren zählt mit seiner Länge von mehr als 230kbp zu den größten Genomen der Säugetier-infizierenden Viren (Davidson, 2003). Der Mehrheit der bisher beschriebenen ~170 (mCMV) (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006) bzw. ~200 (HCMV) (Chee et al., 1990; Cha et al., 1996; Murphy et al., 2003; Dolan, 2004) offenen Leserahmen (ORFs) konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden. Von diesen ORFs sind bei HCMV nur 45 als essentiell für die *in vitro*-Replikation beschrieben (Dunn et al., 2003). Die Homologien zwischen mCMV und HCMV erstrecken sich auf 78 ORFs, die vorrangig im zentralen Bereich beider Genome lokalisiert sind. Diese ORFs können sowohl sequenzhomolog als auch positionshomolog sein, d.h. die Genome sind zueinander colinear (Landolfo et al., 2003).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten besitzen HCMV und mCMV eine unterschiedliche Genomorganisation. Während das HCMV-Genom als Typ E Genom (zwei *unique* Segmente, die jeweils von *terminal repeats* flankiert werden) klassifiziert wird, besitzt mCMV ein Typ A Genom (ein *unique* Segment, flankiert von *terminal repeat* Sequenzen) (Pellett & Roizman, 2007). Nach intragenomische Rekombinationen der *terminal repeats* kann HCMV vier Genom-Isoformen bilden, die in äquimolaren Verteilungen in jeder Viruspopulation vorliegen (Oram et al., 1982). mCMV bildet hingegen nur eine Isoform aus.

1.2.3 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese

In Zellkultur wird der virale Infektionszyklus in ~24h (mCMV) bzw. ~72h (HCMV) durchlaufen. Während dieser Zeit finden alle Stufen der Infektion von der Adsorption, über die virale Genexpression bis hin zur Morphogenese und Virusfreisetzung statt.

1.2.3.1 Penetration der Wirtszelle

Der erste Schritt der Penetration der Zelle ist eine unspezifische Bindung von viralen Glykoproteinen wie gM, gN und gB, an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) der Zelloberfläche (Compton et al., 1993). Dieses leitet das virale *Attachment* ein. Darauf folgend binden virale Glykoproteine an zelluläre Rezeptoren. Mögliche Kandidaten sind der *Epidermal-Growth-Factor-Receptor* (EGFR) (Wang et al., 2003) oder zelluläre Integrine (Isaacson et al., 2007). Für letztere ist eine multiple Heterodimerisierung als Folge der Glykoprotein-Bindung beschrieben worden (Feire et al., 2004). Nach der Bindung fusionieren Virus- und Zellmembran in einem pH-unabhängigen Prozess (Compton et al., 1992) und die „nackten“ Nukleokapside gelangen ins Zytoplasma (*Penetration*) (Boehme & Compton, 2006). Nach Entfernung des Teguments (*Uncoating*) werden die Nukleokapside, vermutlich analog zu HSV-1, über einen Dynein vermittelten, aktiven Transport entlang von Mikrotubuli zur Kernpore transportiert (Sodeik et al., 1997). Dort binden die Nukleokapside an den Kernporenkomplex und die virale DNA wird in das Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al., 2000), wo es nach Fusion der beiden Genomenden zeitweise in einer zirkularisierten und mit Histonen komplexierten „*nucleosome like structure*“ vorliegt (Marks & Spector, 1988).

1.2.3.2 CMV-Genexpression

Die Genexpression ist bei CMV, wie bei allen Herpesviren kaskadenartig reguliert. Dieses gewährleistet die zeitliche Koordination der Genexpression. Dadurch wird die Infektion in *Immediate Early* (IE)-, *Early* (E)- und *Late* (L)-Phase eingeteilt (Honess & Roizman, 1974; Emery & Griffith, 1990; Mocarski et al., 2007).

Unmittelbar nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern startet die IE-Phase, deren Genexpression nicht von der *de novo* Synthese viraler Proteine abhängig ist. Zelluläre Transkriptionsfaktoren binden an den *major immediate early promotor enhancer* (MIEPE) und führen zur Initiation der Transkription der *IE*-Gene. Die IE-Proteine steuern die koordinierte Expression der *E*-Gene (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992), die in Fibroblasten ca. 2h nach Infektion beginnt. Die Genprodukte der E-Phase, wie die virale DNA-Polymerase, sind für den Start der DNA-Replikation notwendig (Pellett & Roizman, 2007). Mit dem Beginn der DNA-Replikation geht die Infektion in die L-Phase über, in der abschließend die Strukturproteine synthetisiert werden.

1.2.3.3 CMV-Replikation und Virion Morphogenese

Die DNA-Replikation von CMV erfolgt analog zu der anderer Herpesviren nach dem Prinzip des *rolling circle*. Die neusynthetisierten viralen Genome bleiben mit der Matrix-DNA als vielgenomige Konkatemere kovalent verbunden. Die Spaltung in lineare Einzelgenome erfolgt erst während der Verpackung der DNA in die Nukleokapside (Marks & Spector, 1988).

Mit dem Zusammenbau der Pro-Kapside in definierten Regionen des Nukleoplasmas setzt die virale Morphogenese ein. Nach Aufnahme der DNA werden die Kapside mit einem vorläufigen Tegument umgeben (Gibson, 2006) und in einem ersten Knospungsprozess (*primary envelopment*) durch die innere Kernmembran (INM) in den perinukleären Raum geschleust. Dabei löst sich die Laminastruktur des Zellkerns lokal auf und die Nukleokapside werden, vermittelt durch virale Glykoproteine (Radsak et al., 1990), mit der INM umhüllt. Nach der Fusion dieser temporären Virushülle mit der äußeren Kernmembran (*outer nuclear membrane*; ONM) werden die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma freigesetzt, wo sie ihr endgültiges Tegument erhalten. Im Anschluss akkumulieren die Kapside an den Membranen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) (Tooze et al., 1993; Fraile-Ramos et al., 2001), in die zuvor die viralen Glykoproteine eingelagert wurden. Die resultierenden Virionen der Reifungsknospung (*secondary envelopment*) besitzen noch eine doppelte Hüllmembran. Die äußere dieser

beiden Hüllmembranen fusioniert mit der Plasmamembran worauf die reifen, einfach umhüllten Viren aus der Zelle freigesetzt werden (Eickmann et al., 2006). Eine schematische Darstellung des viralen *envelopments* ist in Abb.2 dargestellt.

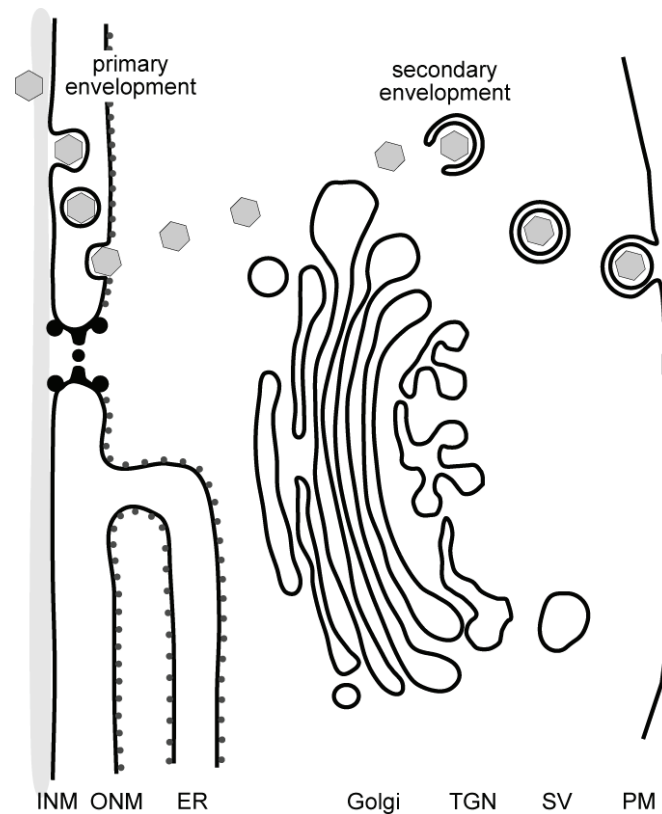


Abb. 2: Primary and secondary envelopment während der Virion-Morphogenese

INM, innere Kernmembran; ONM, äußere Kernmembran; ER, endoplasmatisches Retikulum; TGN, Trans-Golgi-Netzwerk; SV, sekretorische Vesikel; PM, Plasmamembran (verändert nach Eickmann et al., 2006).

1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion

1.3.1 Epidemiologie

HCMV ist in der menschlichen Population ubiquitär verbreitet, wobei die Prävalenz abhängig von Alter und sozioökonomischen Faktoren wie z.B. Kinderzahl und Hygienestatus ist. Untersuchungen zeigen, dass in Mitteleuropa und Nordamerika ca. 50% der Erwachsenen HCMV-positiv sind, in Entwicklungsländern kann die Durchseuchungsrate bereits im Kindesalter bei annähernd 100% liegen (Mocarski et al., 2007).

Die unterschiedliche Prävalenz der HCMV-Infektion liegt in den viralen Übertragungswegen begründet. Da die Infektion meist über direkten Körperkontakt als Tröpfchen- oder Schmierinfektion erfolgt, erhöht ein geringes Hygieneniveau die Infektionswahrscheinlich-

keit. Neben Speichel, Sperma, Zervixsekret, Muttermilch und Urin ist auch Blut als infektiös anzusehen, mit der Folge, dass auch eine Übertragung über Bluttransfusionen und Organtransplantationen möglich ist.

Abgrenzend zur horizontalen Übertragung kann HCMV auch vertikal als transplazentale Infektion des Embryos oder Fetus übertragen werden. Die Inzidenz der kongenitalen HCMV-Infektion beträgt etwa 0,2–2,3% aller Schwangerschaften, allerdings verlaufen nur 10% aller Infektionen symptomatisch. Die HCMV-Infektion ist damit die häufigste, virale kongenitale Infektion. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Kindes ist nach Primärinfektion der Mutter deutlich höher (ca. 40%) als nach einer Reaktivierung (ca. 1%) (Hanshaw & Dudgeon, 1978; Stagno & Whitley, 1985).

1.3.2 Symptomatik der CMV-Infektion

Für den klinischen Verlauf der HCMV-Infektion sind vorrangig Immunstatus sowie Zeitpunkt der Infektion ausschlaggebend. So verläuft die Primärinfektion eines immunkompetenten Individuums meist inapparent. Nur in seltenen Fällen ist eine Symptomatik, ähnlich der einer infektiösen Mononukleose zu beobachten (Kääriäinen et al., 1966). Demgegenüber kann die Infektion eines immunsupprimierten oder immunologisch unreifen Individuums zu schweren klinischen Manifestationen führen. Es lassen sich dabei drei Hauptkollektive von Betroffenen unterscheiden:

I. Nach kongenitaler Infektion des Embryos oder Fetus, in Folge einer Primärinfektion der Mutter, können schweren Embryopathien / Fetopathien wie Schädigung des Nervensystems Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie oder Chorioretinitis beobachtet werden (Boppana et al., 1992; 1997). Auch Spätschäden wie Taubheit und Entwicklungsstörungen können als Folge der Infektion auftreten (Dahle et al., 2000; Ross et al., 2006). Im Gegensatz zu einer Primärinfektion führt die rezidivierende Infektion der Schwangeren seltener zu schweren Infektionen des ungeborenen Kindes, da die Dissemination des Virus durch vorhandene maternale, antivirale Antikörper erschwert wird (Stagno et al., 1982; Whitley, 2004).

II. Ein für rezidivierende HCMV-Infektionen besonders empfängliches Kollektiv stellen Patienten unter immunsuppressiver Behandlung dar (Dowling et al., 1976; Neiman et al., 1977). Hierzu zählen neben Krebspatienten insbesondere Empfänger solider Organtransplantate sowie Empfänger eines Knochenmarktransplantats bzw. hämatopoietischer Stammzellen. Reaktivierungen in seronegativen Empfängern, die ein Transplantat eines seropositiven Spenders erhalten haben, zeigen in der Regel schwere klinische Sym-

ptome, u. a. Hepatitis oder Pneumonie (Reinke et al., 1999; Mocarski et al., 2007). Reaktivierungen in seropositiven Spendern werden hingegen durch Virus-neutralisierende Antikörper begrenzt und nehmen in der Regel einen leichteren Verlauf.

III. Die letzte Gruppe bilden Patienten mit angeborener, z. B. dem *severe combined immunodeficiency* (SCID)-syndrome, oder erworbener Immunschwäche, z. B. *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) nach HIV-Infektion. Auch in diesem Kollektiv können, abhängig vom Immunstatus, symptomatische HCMV-Infektionen beobachtet werden, die sich mehrheitlich als Infektionen der Retina, des Gastrointestinaltrakts, des zentralen Nervensystems sowie der Lunge manifestieren (Moskowitz et al., 1985; Drew, 1992). Erst die Einführung der regulären Therapie mittels HAART (*highly active antiretroviral therapy*) reduzierte das Auftreten der symptomatischen HCMV-Infektion bei AIDS-Patienten erheblich. Allerdings stellt die HCMV-Infektion bis heute in Entwicklungsländern eine der häufigsten opportunistischen Infektionen in diesem Kollektiv dar.

1.3.3 Therapeutische Ansätze und Vakzinierung

Zur medikamentösen Therapie der HCMV-Infektion stehen heute Medikamente wie Ganciclovir, Foscarnet oder abgeleitete Derivate zur Verfügung. Ganciclovir ist ein Nukleosid-analogon, das von viralen Proteinkinasen phosphoryliert und in Form eines Triphosphats von der viralen DNA-Polymerase als Substrat akzeptiert wird. Der Einbau des Analogon führt zum Abbruch der viralen DNA-Synthese und damit zur starken Reduktion der viralen Replikation. Foscarnet hingegen wirkt als Analogon von Pyrophosphaten und hemmt nicht-kompetitiv die virale DNA-Polymerase durch Bindung an die Pyrophosphat-Bindungsstelle (Michel & Mertens, 2006).

In klinischen Studien vermittelt eine passive Immunisierung mit HCMV-spezifischen Immunglobulinen bei Neugeborenen einen guten Schutz, während Organtransplantierte nur geringfügig profitieren (Puius & Snyderman, 2007).

Augenblicklich steht ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV nicht zur Verfügung, seine Entwicklung ist allerdings Ziel verschiedener Forschergruppen. Bisherige Ansätze folgten unterschiedlichen Strategien der Induktion einer schützenden humoralen und zellulären Antwort. So wurden attenuierte Viren (Starr et al., 1981; Plotkin et al., 1989) und rekombinante Glykoproteine (Frey et al., 1999; Pass et al., 1999) als Vakzine entwickelt und getestet. Neuere Ansätze sind die DNA-Vakzinierung (Endr sz et al., 2001; Ye et al., 2002) oder die Immunisierung mit *dense bodies* (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002).

1.4 Die mCMV-Infektion als Modellsystem für die HCMV-Infektion

Alle Cytomegaloviren sind an ihren jeweiligen Wirt hochadaptiert, deswegen muss für Untersuchungen der Infektion und Pathogenese sowie für Vakzinierungsstudien auf ein geeignetes Tiermodell ausgewichen werden. In bisherigen Studien hat sich die Infektion der Spezies Maus mit mCMV als besonders günstig erwiesen. Viele der in diesem Modell gewonnenen Erkenntnisse lassen sich aufgrund der strukturellen, biologischen und genetischen Vergleichbarkeit beider Viren und der Entwicklung analoger Anpassungsstrategien an den jeweiligen Wirt, auf die HCMV-Infektion des Menschen übertragen (Rawlinson et al., 1996; Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b).

Insbesondere ist die Pathogenese der Infektion sowohl im immunkompetenten, als auch im immunsupprimierten Wirt gut vergleichbar (Krmpotić et al., 2003). Im Gegensatz zu HCMV wird mCMV nicht diaplazentar übertragen; viele klinische und histopathologische Parameter der Infektion neonataler Mäuse entsprechen allerdings der kongenitalen HCMV-Infektion (Fitzgerald et al., 1990; Bantug et al., 2008). Nach Terminierung der Primärinfektion etablieren beide Viren eine lebenslange Latenz, mit Lunge und Speicheldrüse als Hauptzielorgane (Balthesen et al., 1993; Reddehase et al., 1994; Reddehase et al., 2002; Krmpotić et al., 2003). Auch die Immunkontrolle der Infektion folgt für beide Viren einer vergleichbaren Kinetik und wird primär durch CD8 T-Zellen vermittelt (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b).

Die mCMV-Infektion der Maus hat sich als effizientes Modellsystem der HCMV-Infektion erwiesen. So stellt das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell der experimentellen Knochenmarktransplantation (KMT) mit anschließender Infektion ein kliniknahes Modellsystem dar, das wichtige Erkenntnisse zur viralen Latenz, zur Pathogenese der Infektion unter Immunsuppression sowie des Beitrags unterschiedlicher Effektorzell-Populationen während der immunologischen Kontrolle der Infektion liefern konnte (Holtappels et al., 2006b; Simon et al., 2006b). Auch die Etablierung der experimentellen Zytotoxikotherapie im Mausmodell lieferte wichtige Erkenntnisse zur Therapie von HCMV-infizierten KMT-Rezipienten (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Einsele & Hamprecht, 2003; Cobbold et al., 2005).

Darüber hinaus ist die mCMV-Infektion ein etabliertes Modell zur Analyse der viralen Immunevasions-Mechanismen. Sowohl HCMV als auch mCMV modulieren effizient die CD8 T Zell-vermittelten Immunkontrolle (Reddehase, 2002). Zwar weisen die Immunevasion vermittelten Gene von HCMV und mCMV keine Sequenzhomologien auf, trotzdem zeigen beide Viren analoge Mechanismen der Immunevasion, die eine Übertragung der in einem

System gewonnenen Erkenntnisse auf das jeweils andere System erlauben (Reddehase, 2002; Reddehase et al., 2004).

1.5 Immunkontrolle der CMV-Infektion

Die primäre CMV-Infektion des immunkompetenten Wirts wird in der Regel sowohl vom angeborenen (*innate immunity*) als auch vom erworbenen Immunsystem (*adaptive immunity*) effizient kontrolliert. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören u. a. Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Effektorfunktionen der angeborenen Immunität gehen der einige Tage später einsetzenden Aktivierung der adaptiven Immunität voraus. Während der frühen Phase der Infektion wird die Kontrolle der CMV-Infektion vorrangig über NK-Zellen vermittelt (Bukowski et al., 1985; Arase et al., 2002; Jonjic, et al., 2006). Allerdings können die NK-Zellen die CMV-Infektion nicht dauerhaft kontrollieren, so dass die Etablierung der Virus-spezifischen CD8-Antwort zwingend für die Terminierung der Infektion notwendig ist (Welsh et al., 1991).

Zur adaptiven Immunantwort gehören neben Antigen-spezifischer Antikörper, die von B-Zellen sezerniert werden, die verschiedenen Populationen der T-Zellen, u. a. CD4 und CD8-positive T-Zellen. Die Antikörper-vermittelte humorale Immunität spielt während der Kontrolle der CMV-Primärinfektion nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings limitiert sie die Virus-Dissimination im Verlauf einer rekurrenten Infektion und vermittelt Schutz gegen sekundäre CMV-Infektionen (Jonjic et al., 1994; Reddehase et al., 1994; Klenovsek et al., 2007; Wirtz et al., 2008).

Die Haupteffektorzellen der akuten CMV-Infektion sind antivirale CD8 T-Zellen, die zur Beendigung der produktive Infektion in den Organen führen und langfristig die Kontrolle der Infektion vermitteln (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006b). Eine Sonderstellung nimmt die immunologische Kontrolle der Infektion in der Speicheldrüse ein, die von der Freisetzung von Interferon (IFN) γ - durch CD4 T-Zellen abhängig ist (Debes et al., 2006; Humphreys et al., 2007).

1.5.1 Reaktion des angeborenen Immunsystems gegen CMV

NK-Zellen sind die Haupteffektoren der angeborenen Immunität. Sie erkennen Antigen-unabhängig infizierte oder transformierte Zellen und repräsentieren eine primäre Verteidigungslinie des Immunsystems. NK-Zellen vermitteln ihre antivirale Aktivität durch Sekre-

tion von Zytokinen, u. a. IFN- γ , TNF- α , Interleukin (IL) -5, IL-10 und IL-13, sowie Chemokinen, die das Wachstum und die Dissemination von Pathogenen oder Tumoren kontrollieren. Zusätzlich beeinflussen die Zytokine auch die adaptive Immunantwort. Darüber hinaus sind NK-Zellen auch zur direkten Zytolyse von Zielzellen, vermittelt durch Exozytose von Perforin und Granzym (Tay et al., 1997; van Dommelen et al., 2003; Loh et al., 2005) oder durch Aktivierung apoptotischer Signalwege, in der Lage. Die Bedeutung dieser ersten Immunantwort wird dadurch unterstrichen, dass nach NK-Zell-Depletion im murinen mCMV-Infektions-Modell vermehrt Reaktivierungen und höhere Organtiter beobachtet wurden (Bukowski & Welsh, 1985). In klinischen Studien konnte vergleichbares für die HCMV-Infektion gezeigt werden. So war in Transplantatempfängern eine niedrige zytotoxische Aktivität der NK-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Venema et al., 1994).

Einen besonderen Einfluss haben NK-Zellen auf die genetisch determinierte „angeborene Immunität“. So ließ sich die unterschiedliche mCMV-Suszeptibilität von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen auf das *CMV1*-Allel (*CMV1'*) innerhalb des NK-Locus zurückführen (Allan & Shellam, 1984; Scalzo et al., 1990). Dieses dominante Allel kodiert im mCMV-resistenten C57BL/6 Mausstamm für das Protein Ly49H (Brown et al., 2001; Daniels, et al., 2001; Lee et al., 2001). Ly49H ist ein aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen und vermittelt die Erkennung von mCMV-infizierten Zellen durch Bindung an das Genprodukt des viralen ORFs *m157* (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). Die aktivierten NK-Zellen sezernieren im Folgenden IFN γ und lysieren erkannte Zellen. Neben der Ly49H-vermittelten Erkennung sind noch weitere regulatorische Elemente im Zusammenspiel zwischen Virus und NK-Zelle beschrieben worden (Jonjic, et al., 2006; Vidal & Lanier, 2006).

1.5.2 Reaktion des adaptiven Immunsystems gegen CMV

Die Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems zur Kontrolle der CMV-Infektion sind Virus-spezifische T-Zellen, deren Antwort nach etwa 2 bis 3 Tagen einsetzt und ihr Maximum nach 10 Tagen erreicht (Quinnan et al., 1978; Böhm et al., 2008). T-Zellen lassen sich durch die Komposition ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in zwei Gruppen einteilen, $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Zu den $\alpha\beta$ -T-Zellen gehören die beiden großen Populationen der zytolytischen T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T_H C) außerdem regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und NKT-Zellen (*natural killer* T-Zellen).

Zusätzlich zum TCR exprimieren T-Zellen noch Co-Rezeptoren, deren klassische Vertreter CD4 und CD8 sind und deren Expression T_H C ($CD4^+$) von CTL ($CD8^+$) unterscheiden. Während CD8 T-Zellen mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren,

erkennen CD4 T-Zellen von MHC-Klasse-II präsentierte Peptide auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (Germain, 1994). Die spezifische Aktivierung einer T-Zelle erfolgt durch Interaktion ihres TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex bei gleichzeitiger Interaktion co-stimulierender Moleküle mit Liganden der Zielzelle (Rudolph et al., 2006). In der Folge kommt es zur Ausbildung von Effektorfunktionen und einer umfangreichen Proliferation der aktivierten T-Zellen (klonale Expansion). Gleichzeitig werden Memory-T-Zellen gebildet, die als Gedächtniszellen im Körper verbleiben und bei erneutem Antigenkontakt wieder aktiviert werden können (Stemberger et al., 2007a; 2007b). Zu den Effektorfunktionen der CTLs gehört ihre direkte zytolytische Aktivität (Doherty, 1993) sowie die Sezernierung verschiedener Zytokine (z.B. TNF, IFN γ) und Chemokine (Harty et al., 2000). Demgegenüber modulieren T_HC über die Sekretion von Zytokinen (z.B. IL2, IL4, IL10, IL13) sowohl die humorale als auch die T-Zell Immunantwort. Die Rolle der weiteren Subklassen (T_{regs}, $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen) ist noch nicht endgültig aufgeklärt; $\gamma\delta$ -T-Zellen sollen bei der Erkennung bestimmter bakterieller Infektionen eine Rolle spielen (Born et al., 2006), während den NKT-Zellen (Vivier et al., 2008) und T_{regs} immunmodulatorische Funktionen zugesprochen werden (Rouse et al., 2006; Cools et al., 2007; Sakaguchi et al., 2008).

Die herausgehobene Stellung der CTL-vermittelten Immunkontrolle bei Überwindung der CMV-Infektion ist vielfach belegt (Quinnan et al., 1978; Reddehase et al., 1985; 1987; Steffens et al., 1998; Holtappels et al., 2006b). Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass ein präemptiver adoptiver Transfer (AT) von CD8⁺ T-Lymphozyten immunsupprimierte BALB/c-Mäuse vor einer mCMV-Infektion schützen konnte. Erfolgte der AT 6 Tage nach Infektion (p.i.), also zu einem Zeitpunkt, zu welchem schon deutliche Organmanifestationen der CMV-Erkrankung zu erkennen waren, vermittelten die T-Lymphozyten auch eine effiziente Kontrolle der bestehenden Infektion (therapeutischer T-Zell-Transfer), wenngleich in diesem Fall eine ~10fach höhere Zellzahl erforderlich war (Reddehase et al., 1985). Die CD8⁻ Restpopulation (inkl. CD4⁺ T-Zellen) hingegen zeigte hingegen keine schützende Wirkung, so dass davon auszugehen ist, dass CD8⁺ T-Zellen allein ausreichend sind, den Schutz zu vermitteln.

In klinischen Studien konnte vergleichbar gezeigt werden, dass die Kontrolle der HCMV-Infektion nach KMT mit der Rekonstitution virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen (Reusser et al., 1991) korreliert. Entsprechend lässt sich durch den Transfer antiviraler CTL-Linien die Inzidenz der CMV-Erkrankung nach KMT reduzieren (Riddel et al., 1992; Walter et al., 1995; Cobbold et al., 2005).

In jeder CTL-vermittelten Immunantwort dominieren bestimmte Peptid-Spezifitäten, die über MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I Glykoproteine präsentiert werden. So sind in der BALB/c-Maus (Haplotyp H-2^d) zwei immundominante Peptide beschrieben worden; zum einen das vom frühen regulatorischen IE1-Protein abgeleitete Peptid m123₁₆₈₋₁₇₆ (Reddehase & Koszinowski, 1984; Reddehase et al., 1989) und zum anderen ein Peptid aus dem ORF m164 (m164₂₅₇₋₂₆₅) (Holtappels et al., 2002a). Für den Haplotyp H-2^b der C57BL/6-Maus sind mehrere immundominante Peptide beschrieben worden, u. a. M38₃₁₆₋₃₂₅, M45₉₈₅₋₉₉₃ und m139₄₁₉₋₄₂₆ (Munks et al., 2006).

1.6 Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I

Die Erkennung und Eliminierung von Virus-infizierten oder transformierten Zellen wird von CD8 T-Zellen vermittelt und erfordert die Interaktion zwischen einer Antigen-präsentierenden Zelle und CTL (Marrack & Kappler, 1987). Dafür präsentiert die APC zuvor intrazellulär prozessierte und an den spezialisierten Proteinkomplex MHC-Klasse-I gebundene antigene Peptide an der Zelloberfläche (siehe 1.6.2; Abb. 3). Diesen Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex erkennt die CTL über den T-Zell Rezeptor (TCR), der im Anschluss zusammen mit akzessorischen Molekülen wie CD8 oder CD4 die sogenannte immunologische Synapse ausbildet. Dieses aktiviert in der Folge die CTL. Aktivierte CTL dienen dem Immunsystem als Effektorzellen, die infizierte Zellen erkennen und diese aus dem Organismus eliminieren (Rock et al., 2002; 2004).

1.6.1 MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex

Der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex ist ein Heterotrimer bestehend aus der α -Kette (44-47kDa), dem mit ihr nicht kovalent verbundenen β_2 -Microglobulin (12kDa) sowie dem präsentierten antigenen Peptid. Die α -Kette verankert den Komplex in der Zellmembran und bindet in einer von den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen gebildete Grube die 8-11 Aminosäuren langen Peptide. Die $\alpha 3$ -Domäne und das β_2 -Microglobulin bilden jeweils eine Immunglobulin-ähnliche Struktur aus. An die $\alpha 3$ -Domäne bindet das CD8-Molekül der CTL und stabilisiert den MHC-TCR Komplex. Das β_2 -Microglobulin hingegen stabilisiert die Peptidbindungsgrube.

Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von verschiedenen MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen konnte die Bindung der Peptide an die α -Kette genauer charakterisiert werden. Die beiden etwa 90 Aminosäuren langen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen bilden eine aus acht antiparallelen β -Faltblättern bestehende Plattform, die von zwei parallelen α -Helices begrenzt

wird. Diese Struktur formt eine $\sim 2,5\text{nm} \times 1\text{nm} \times 1,1\text{nm}$ weite Grube mit geschlossenen Enden und begrenzt so die Länge der gebundenen Peptide (Bjorkman et al., 1987a; b; Young et al., 1995). Die Peptide binden in der Grube über sogenannte Anker-Aminosäuren, deren Positionen im Peptid vom MHC-Klasse-I-Haplotyp abhängig sind (Rammensee et al., 1993).

Die Assoziationsreaktion der Peptid-Bindung an MHC-Klasse-I ist eine zu sättigende, niederaffine Interaktion mit einer Dissoziationskonstante von $[K_d] \sim 10^{-5}\text{M} - 10^{-7}\text{M}$. Dabei zeigt die Reaktion eine langsame *on-rate* $[K_{on}]$, d.h. die Beladung mit Peptid erfolgt in Minuten, und eine sehr langsame *off-rate* $[K_{off}]$, d.h. der gebildete Komplex bleibt für Stunden bis Tage stabil (Boyd et al., 1992).

1.6.2 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg

Der klassische MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg (siehe Abb. 3) sorgt über die Kopplung verschiedener inter- und intramolekularer Interaktionen für die kontinuierliche Präsentation eines Abbildes der Proteinexpression einer Zelle auf ihrer Oberfläche. Die hierfür verwendeten Peptide sind Produkte der zellulären Protein-Degradation, die für die meisten zytoplasmatischen Proteine über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abläuft (Goldberg, 2003; Cresswell et al., 2005). Alte oder während der Synthese fehlgefaltete Proteine (*defective ribosomal products*, DRiPS) werden initial an der Aminogruppe von Lysin mit einem *tag* von vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen versehen (Yewdell, 2006). Dieser *tag* dient als Signal für das 26S-Proteasom, eine multikatalytische Protease mit drei unterschiedlichen Peptidase-Aktivitäten, die die Hydrolyse nach großen hydrophoben (*chymotrypsin-like*), nach basischen (*trypsin-like*) oder nach sauren (*post-acidic* oder *caspase-like*) Resten katalysiert. Das gesamte Proteasom ist ein Multiproteinkomplex aus einer 700kDa schweren Haupteinheit, sowie weiteren katalytischen Einheiten. In lymphatischen Geweben oder nach IFN γ Stimulus werden die drei aktiven Zentren der β -Untereinheit durch LMP1, LMP7 (*low molecular weight proteins*) und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex subunit 1*) ersetzt und das Proteasom somit zum Immunoproteasom modifiziert. Hierdurch werden die proteolytischen Eigenschaften modifiziert und die Diversität der generierten Peptide erhöht (Kloetzel, 2004).

Der überwiegende Teil der vom Proteasom generierten Peptide wird direkt durch Amino- und Endopeptidasen des Zytoplasmas weiter zu Aminosäuren abgebaut. Der restliche Teil der entstandenen reifen Peptide (8- bis 11-mere; Chang et al., 2005) oder N-terminal verlängerten *Precursor*-Epitope (>12 Aminosäuren) wird in einem ATP-abhängigen Schritt mittels TAP (*transporter associated with antigen presentation*) in das Endoplas-

matische Retikulum (ER) transloziert. Dort trimmen Aminopeptidasen wie ERAP1 (*human*, Saric et al., 2002; York et al., 2002) bzw. ERAAP (*murin*; Serwold et al., 2002) die N-terminal verlängerten *Precursor*-Peptide weiter (Kloetzel & Ossendorp, 2004) und die reifen Peptide werden in einem Multienzymkomplex auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Baas et al. 1992). Diese MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe folgen dem sekretorischen *Pathway* zur Zelloberfläche und können dort von CD8 T-Zellen erkannt werden (Rock et al., 2004). Neben diesem klassischen Weg der MHC-Klasse-I-Beladung sind noch weitere TAP- und Proteasom-unabhängige Wege beschrieben worden. So wurde für HIV und HBV die Generierung von antigenen Peptiden im ER und Trans-Golgi beschrieben (Hammond et al., 1995; Gil-Torregrosa et al., 2000). Für die EBV-Infektion liegen Daten vor, die ein TAP-unabhängiges, Proteasom-abhängiges Beladen von MHC-Klasse-I-Molekülen zeigen (Lautscham et al., 2003).

In den bisher beschriebenen Antigenpräsentations-Wegen werden bereits in der Zelle vorhandene Proteine degradiert und anschließend präsentiert. Allerdings können auch extrazelluläre Proteine oder Proteinbruchstücke von professionellen APC zur Präsentation genutzt werden. Diese Antigenquellen werden von der Zelle mittels Endozytose oder Phagozytose aufgenommen, degradiert und in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust (Raghavan et al., 2008). Eine besondere Bedeutung dieses als *cross-presentation* bezeichneten Phänomens zeigt sich darin, dass trotz starker Immunevasion (siehe 1.6.3) in CMV-infizierten Individuen CD8 T-Zellen erfolgreich *geprimt* werden (Gold et al., 2004; Böhm et al., 2008).

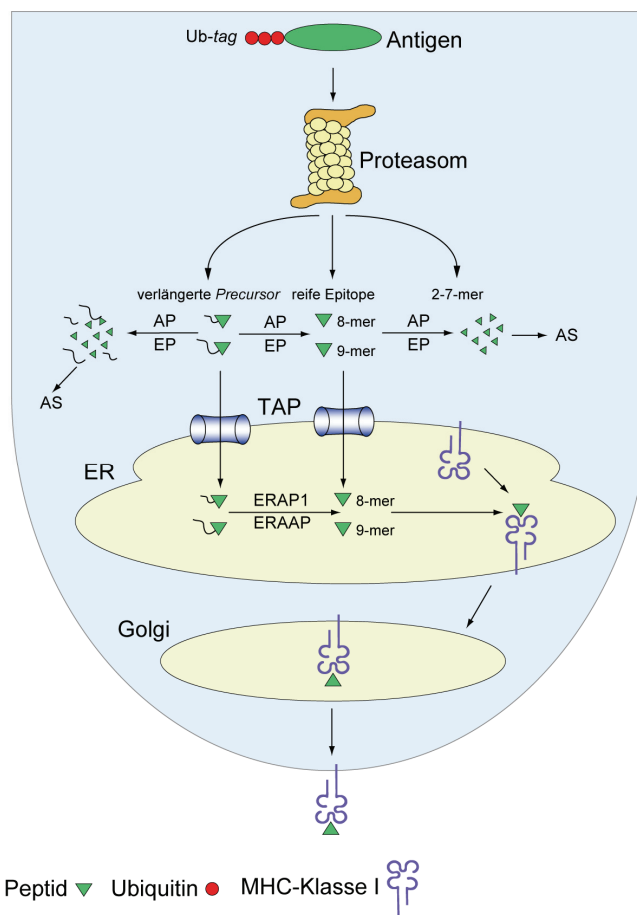


Abb. 3: Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweges

Ubiquitinierte Proteine (Antigene) werden im Zytosol vom Proteasom degradiert. Die resultierenden Peptide können durch Amino- (AP) und Endopeptidasen (EP) bis hin zu Aminosäuren (AS) weiter abgebaut werden. Einige Epitop-Precursor und reife Epitope können der Degradation entkommen und werden über den TAP-Komplex ins ER-Lumen transportiert. Die dort lokalisierten Aminopeptidasen ERAP1 oder ERAAP lassen die Peptide weiter reifen, die im Anschluss an leere MHC-Klasse-I-Moleküle binden (verändert nach Reddehase, 2002; Rock et al., 2004) und an der Zelloberfläche präsentiert werden.

1.6.3 Immunevasion der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenpräsentation durch mCMV

Cytomegaloviren haben im Laufe der Evolution, wie viele andere Viren auch, Mechanismen entwickelt, der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Eine besondere Rolle spielt dabei der Eingriff von HCMV und mCMV in die CTL-Immunantwort durch die Modulation der MHC-Klasse-I-Expression (Reddehase, 2002). Für mCMV sind bisher drei Proteine beschrieben, die in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eingreifen (siehe Abb. 4). Sie werden als Immunevasine oder vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bezeichnet. Die vRAPs sind die Genprodukte der ORFs *m04*, *m06* und *m152*. Alle drei sind Typ I Glykoproteine mit einer *early* Expressionskinetik.

m152/gp40 bindet über seine lumenale Domäne transient an die lumenale Domäne der in die ER-Membran inserierten MHC-Klasse-I-Moleküle und vermittelt deren Retention und Akkumulation in einem ERGIC/cis-Golgi-Kompartiment (*ER-Golgi intermediate compartment*) (Del Val et al., 1992; Ziegler et al., 1997; 2000). In der Folge führt dies zu einer signifikanten Reduktion der Dichte von Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche infizierter Zellen (del Val et al., 1989; 1992). Während m152/gp40 schnell lysosomal abgebaut wird, akkumulieren die MHC-Peptid-Komplexe im ERGIC (Ziegler et al., 2000). Da nach Deletion des ORF m152 die MHC-Klasse-I-Expression an der Zelloberfläche wieder hergestellt wird (Krmpotić et al., 1999; Holtappels et al., 2004; 2006), gilt m152/gp40 als das zentrale Immunevasin von mCMV. Darüber hinaus reguliert m152/gp40 noch weitere *MHC-like molecules*, wie z. B. Mitglieder der RAE1 Molekülfamilie (RAE1 α , β , γ , δ und ϵ) und Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D (Krmpotić et al., 2002).

Im Gegensatz zu m152/gp40 bindet m06/gp48 im ER stabil an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe und vermittelt deren Einschleusung in den endolysosomalen Abbauweg der Zelle. Dieser gerichtete Transport wird über die Adaptorproteine AP-1A/3-A, die ein Di-leucin-Motiv im zytoplasmatischen Teil des m06/gp48 erkennen, vermittelt. Im Lysosom werden sowohl m06/gp48 als auch das MHC-Klasse-I-Molekül abgebaut (Reusch et al., 1999; 2002). Als Folge reduziert sich gleichfalls die MHC-Oberflächenexpression.

Im Gegensatz zu m152/gp40 und m06/gp48 verhindert m04/gp34 nicht die Präsentation von Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen an der Zelloberfläche. Das Protein m04/gp34 bindet im ER stabil an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen und kann zusammen mit diesen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Kleijnen et al., 1997; Kavanagh et al., 2001b). Wie m06/gp48 besitzt auch m04/gp34 ein Adaptorprotein-Bindemotiv (YRRF), welches mit den Adaptorproteinen AP-2/4 interagieren kann (Nakatsu & Ohno, 2003). Obwohl die solitäre Expression von m04/gp34 die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht reduziert (Wagner et al., 2002), wurde in der Literatur eine negative Wirkung des Proteins auf die CD8 T Zell-Aktivierung beschrieben (Lilley & Ploegh, 2005). Insbesondere wurde postuliert, dass die Bindung von m04/gp34 die Erkennung des MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex durch den TCR verhindert (Kavanagh et al., 2001a). In unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass die Erkennung des Komplexes gerade nicht behindert wird (Holtappels et al., 2006a), so dass der Beitrag von m04/gp34 zur mCMV Immunevasion derzeit unklar ist. Allerdings wird dem Protein eine kooperative Wirkung in Verbindung mit m152/gp40 und m06/gp48 zugesprochen (Kavanagh et al., 2001a;

LoPiccolo et al., 2003). Zusätzlich wird die Rolle von m04/gp34 als Immunevasin der NK-Zell-Erkennung diskutiert (Kleijnen et al., 1997; Pinto & Hill, 2005).

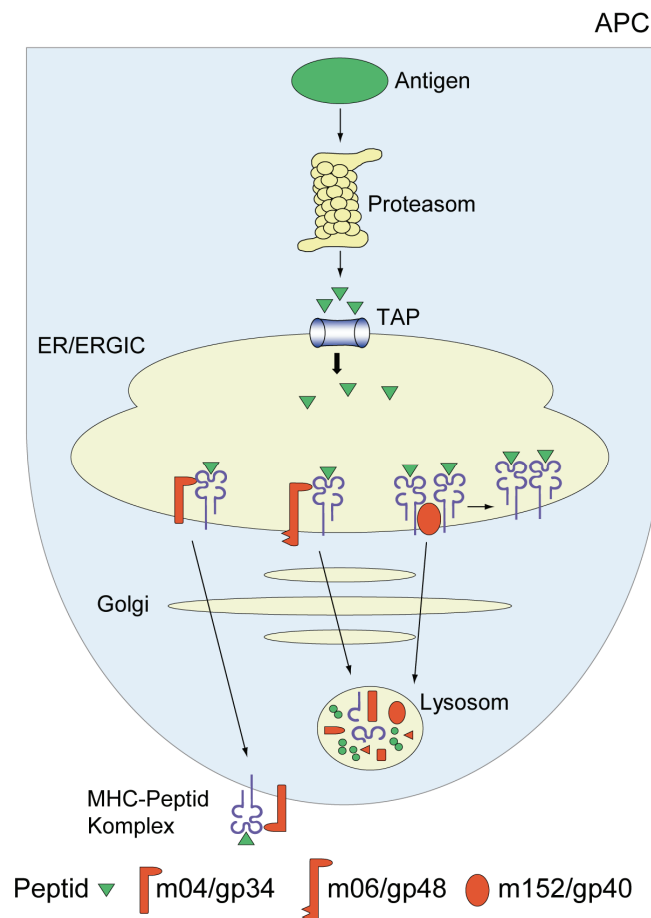


Abb. 4: Funktionen der Immunevasine/vRAPs des mCMV

m152 induziert die Akkumulation der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe im ER/ERGIC. m06 bindet an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe und vermittelt ihren lysosomalen Abbau. m04 bindet ebenfalls an die MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe und ist mit diesen auf der Zelloberfläche nachweisbar (verändert nach Reddehase, 2002).

1.7 SIINFEKL als Modellpeptid der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Das H2-K^b restringierte, immundominante MHC-Klasse-I-Peptid SIINFEKL ist ein antigenes Peptid des Ovalbumin (OVA) und von Aminosäureposition 257 bis 264 lokalisiert (Rötzschke et al., 1991). OVA ist ein 42kDa großes Protein des Hühnereiweiß und gehört zur Gruppe der Serpine (Serinproteaseinhibitoren) (Nisbet et al., 1981). Zum Zeitpunkt seiner Beschreibung war SIINFEKL das erste über MHC-Klasse-I präsentierte Peptid eines löslichen Proteins (Moore et al., 1988). Aufgrund seines modellhaften Charakters für die Antigenpräsentation und Induktion einer CD8 T Zell-Antwort sind für das SIINFEKL-Modell-System zahlreiche Nachweissysteme entwickelt worden.

Der monoklonale Antikörper (mAb) T-AD 25.D1.16 erkennt spezifisch mit SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär (Porgador et al., 1997) und kann damit für antikörperbasierte Untersuchungen der Antigenpräsentation wie beispielsweise Zytofluorometrie oder Immunfluoreszenz eingesetzt werden.

Die klonale T-Zelllinie OT-1 (Kelly et al., 1993) sowie die von ihr abgeleitete transgene Maus (OT-1 Maus) (Hogquist et al., 1994) exprimieren einen SIINFEKL-K^b spezifischen TCR, der die variablen Ketten Vα2 und Vβ5 besitzt und dessen Kristallstruktur aufgeklärt ist (Fremont et al., 1995; siehe Abb. 5). Aus der OT-1 Maus lassen sich leicht TCR-transgene T-Zellen gewinnen und ähnlich einer T-Zelllinie in Stimulations- und Zelltransfer-Experimenten verwenden. Auch ist SIINFEKL als Fremdantigen in einer Vielzahl von Infektions- und Tumorsystemen zur Untersuchung der Antigenpräsentation und T-Zell Kontrolle eingesetzt worden (Moore et al., 1988; Sigal et al., 1999).

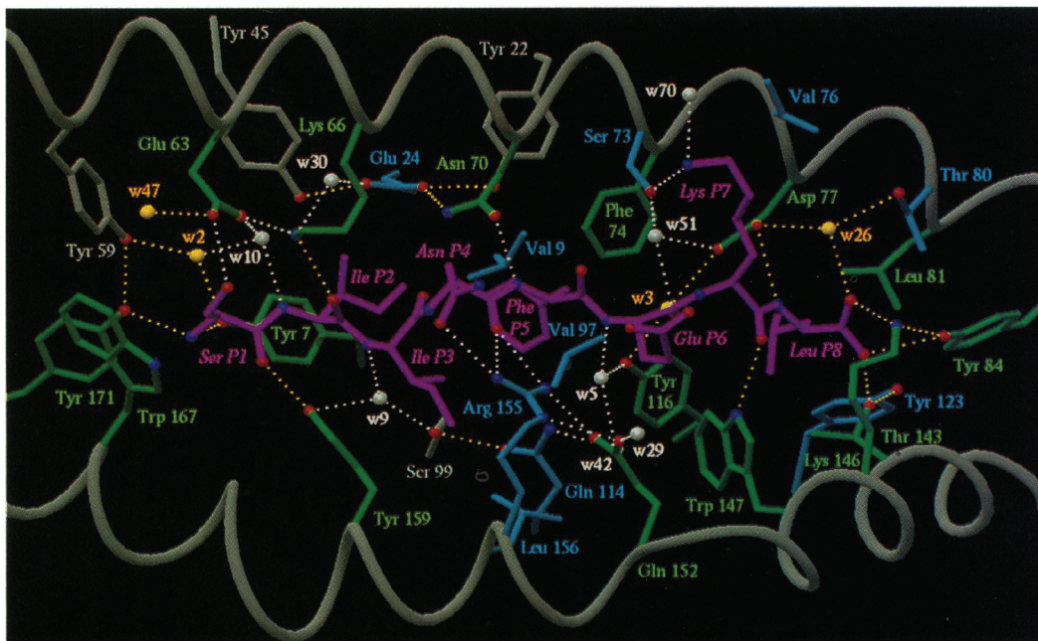


Abb. 5: Modell der Interaktion von SIINFEKL mit H2-K^b

Simulation der Darstellung der Interaktion von SIINFEKL mit H2-K^b basierend auf einer 2,5 Å Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Komplexes. Deutlich ist das von den Seitengruppen (grün und blau) der Peptidbindungstasche umgebene Peptid (lila) zu erkennen, das von entsprechenden Wasserstoffbrücken (weiß und gelb) gebunden wird (Fremont et al., 1995).

1.8 Der mCMV ORF m164 und das von ihm kodierte Protein m164/gp36,5

Der ORF m164 wurde bioinformatisch mit einer Länge von 1281 Nukleotiden (n223.649-222.369) vorhergesagt (Rawlinson et al., 1996). Das korrespondierende Protein von 428AS entspricht einer Proteinmasse von ungefähr 46,6kDa. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der ORF nur 1011 Nukleotide (n223.379-222.369) umfasst und für ein einfach N-glykosyliertes Typ-I Transmembranprotein kodiert. Nach Reifungsspaltung eines N-terminalen Signalpeptids und anschließender einfacher Glykosylierung im ER wurde die Proteinmasse mit 36,5kDa bestimmt. Das reife Protein m164/gp36,5 ist ein sehr stabiles *early*-Protein, das sich nach Infektion nach ca. 2-3h nachweisen lässt und für den gesamten Zeitraum der Infektion abundant im ER exprimiert bleibt. Mittels Immunfluoreszenz lässt es sich in der ER- und der äußeren Kernmembran lokalisieren (Däubner, 2007).

Dem Protein m164/gp36,5 konnten im Rahmen der Charakterisierungs-Studien mehrere zellbiologische Besonderheiten zugeordnet werden. Es gehört zu der kleinen Gruppe der ER-lokalisierten Transmembranproteine, die die Transmembran-Domäne als ER-Retentions-Signal nutzen. Hierbei ist das Protein das erste Nicht-Strukturprotein eines DNA-Virus, dem diese Eigenschaft zugeordnet werden konnte. In FRAP-(*fluorescence recovery after photobleaching*)-Analysen zeigte es eine sehr hohe laterale Diffusionsgeschwindigkeit in der ER-Membran. Diese liegt mit einem Diffusionskoeffizienten D von $\sim 15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Däubner, 2007) deutlich oberhalb des für die meisten Membranproteine bestimmten $D \sim 0,1-0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Klonis et al., 2002).

Nach Deletion der ORF *m151 bis m165* erwies sich das Protein m164/gp36,5 als nicht essentiell (Thäle et al., 1995), gleiches konnte auch mit einer in unserem Labor generierten m164-Deletionsmutante gezeigt werden (J. Müller, Diplomarbeit). Auch eine Funktion im viralen Replikationszyklus konnte ihm bisher nicht zugeordnet werden. Von immunologischer Seite ist die Lokalisation mehrerer antigener Peptide im m164/gp36,5 bemerkenswert. Diese *primen* sowohl in BALB/cJ-Mäusen als auch in C57BL/6-Mäusen CD8 T-Zellen. Von näherem Interesse ist insbesondere ein D^d restringiertes Peptid an Position m164₁₅₀₋₁₅₈. Dieses Peptid induziert in BALB/cJ-Mäusen eine immundominante CD8-Antwort und ist das einzige bisher bekannte Peptid, das in infizierten Fibroblasten der Kontrolle der vRAPs entkommt (Holtappels et al., 2002a).

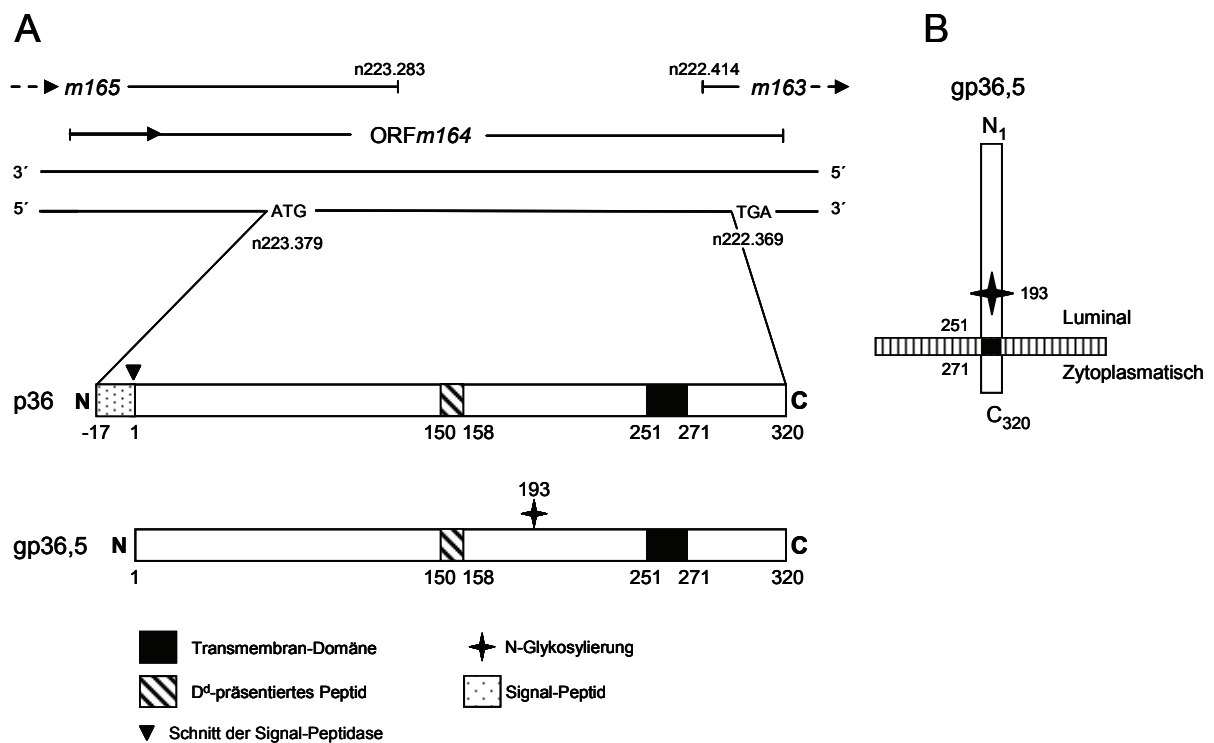


Abb. 6: Schematische Darstellung des Proteins m164/gp36,5

A. Vorhersage der Sekundär-Struktur des primären Translationsprodukts m164/p36 und des prozessierten Proteins m164/gp36,5. (Oben) Lokalisation des von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagten ORF m164 im mCMV-Genom mit den Überlappungen der benachbarten ORFs. Die Pfeile markieren die Transkription auf dem C-Strang der DNA. Der nachgewiesene tatsächliche Transkriptionsstart ist durch ATG gekennzeichnet. (Unten) Schematische Darstellung der Sekundär-Struktur mit den Angaben der korrespondierenden Aminosäuren der Transmembran-Domäne, des D^d-restringierten antigenen Peptids, der N-Glykosylierung sowie des vorhergesagten Signal-Peptids. Aus dem primären Translationsprodukt m164/p36 entsteht nach Abspaltung des Signal-Peptids und folgender N-Glykosylierung das reife Protein m164/gp36,5.

B. Membran-Topologie des reifen m164/gp36,5. Als Typ-I Transmembranprotein ist das N-terminale Ser1 ER-luminal und das C-terminale Ser320 zytoplasmatisch. (Abb. verändert nach Däubner, 2007).

1.9 Zielsetzung

Die mCMV-Infektion wird von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen kontrolliert. Diese erkennen auf MHC-Klasse-I-Komplexen präsentierte virale Peptide und lysieren die infizierte Zelle. Dieser Kontrolle versucht mCMV durch Beeinflussung der Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Komplexe zu entkommen. Die hierfür verantwortlichen Genprodukte wurden als m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 identifiziert (Reddehase, 2002) und aufgrund ihres regulatorischen Einflusses auf die Antigenpräsentation als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) bezeichnet. Bisherige Untersuchungen zeigten die qualitative Verringerung der MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche nach Expression der vRAPs (Wagner et al., 2002). Im *in vivo* Modell der Infektion zeigten allerdings die vRAPs nur geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der CD8 T Zell Spezifitäten und auf das CD8 T Zell-*Priming* (Munks et al., 2007; Böhm et al., 2008).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es mCMV-Rekombinanten zu generieren, die den spezifischen Nachweis eines viral kodierten Reporter-Peptids auf der Zelloberfläche erlauben. Mit Hilfe der mCMV-Rekombinanten sollte im Anschluss Effizienz und Spezifität der mCMV-vermittelten CD8 T Zell-Immunevasion näher untersucht werden. Hierfür wurde das gut charakterisierte Modell-Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) im viralen Kontext zugänglich gemacht, so dass erstmals im herpesviralen System auf SIINFEKL basierte Techniken zurückgegriffen werden konnte.

Nach erfolgreicher Integration des Modell-Peptids in das Protein m164/gp36,5 und Generierung rekombinanter Viren mittels BAC-Technologie sollten diese *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Hierbei standen neben der molekularen und biochemischen Charakterisierung insbesondere die immunologischen Eigenschaften der generierten mCMV-Rekombinanten im Vordergrund. Anschließend sollte in der Arbeitsgruppe die absolute Quantifizierung von Oberflächenantigenen im Zytofluorometer etabliert und mit dieser Technik die mCMV-vermittelte Immunevasion näher untersucht werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

autoMACS	(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)
Brutschrank B6 und T18 (Bakterien)	(Heraeus, Hanau)
Brutschrank B12 und B5060 (Zellen)	(Heraeus, Hanau)
CO ₂ -Inkubator	(Heraeus, Hanau)
Zytofluorometer	FACSort (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)
Elektroporator	Gene Pulser™ (BioRad, München)
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot (Zeiss, Jena)
Flüssigstickstofftank	(Messer, Griesheim)
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store (INTAS, Göttingen)
Heizplatte / Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke und Kunkel, Staufen)
Invertmikroskop	Leica DM (Leica, Wetzlar)
MACS <i>MultiStand</i>	(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)
Mikrotom	HM 355 (Microm, Walldorf)
Mikrowelle	(Privileg, Fürth)
Paraffinerhitzer	HistoTAPplus (Leica, Bensheim)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
	Ultrospec III (Pharmacia, Erlangen)
	Nanodrop (PEQLAB, Erlangen)
Pipetten	(Gilson, Villies Le Bel, Frankreich)
	(Eppendorf, Hamburg)
	(Rainin, Oakland, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy (INTEGRA Biosciences, Fernwald)

<i>Power Supply</i>	EPS 301, EPS 600 (Pharmacia, Erlangen)
Präparative Zentrifuge	Sorvall RC5C Plus (Langenselbold)
<i>real-time</i> PCR System	ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, USA)
Schüttelinkubator	Cellstar (NUNC, Wiesbaden) Certomat (Labotec, Wiesbaden)
Schüttelwasserbad	OLS 200 (Grant, VWR, Wien)
Sicherheitswerkbank	HERA safe HS 12/2 und HS 15/2 (Heraeus, Hanau) Template Tamer Oncor (Appligene, Heidelberg) Template Tamer Captair bio (Erlab, Köln)
Tischzentrifugen	centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg) centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg) centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Labofuge 200 (Heraeus, Hanau) Labofuge 400 (Heraeus, Hanau) Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau) Mikrozentrifuge AL (Roth, Karlsruhe) Multifuge 3 S-R (Heraeus, Hanau)
<i>Thermocycler</i>	GenAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, USA)
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	FluoLink (Bachofer, Reutlingen) (Vetter GmbH, Wiesbaden)
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus (Langenselbold)
Vollschutz-Kleintierbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Waagen	BP 61 (Sartorius, Göttingen) Kern 510 (Albstadt) Kern 572 (Albstadt)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)

Zählmikroskop <i>ELISpot</i>	Olympus SZX 12 (Olympus, Hamburg) Highlight 3100 (Olympus, Hamburg)
Zählmikroskop Zellen	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)

2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	1,8ml <i>CryoTube</i> (Nunc International, Dänemark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4487) 10ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4488) 25ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4489)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 9166017V) 2ml (Braun, Melsungen; Nr. 4606027V) 5ml (HSW, Tuttlingen) 10ml (HSW, Tuttlingen) 20ml (HSW, Tuttlingen)
Elektroporationsküvetten	0,1cm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2010-LE) 0,2cm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2020-LE)
<i>ELISPOT</i> -Microtiterplatten	96well Platte mit Biodyne B Membran (Nunc International, Dänemark; Nr. 256154)
FACS-Röhrchen	12x75mm Rundboden RIA tube (Falcon, Heidelberg; Nr. 2008)
Filterspitzen	Rainin 10µl (Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GP-L10F) Rainin 200µl (Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GP-L200F) Rainin 1.000µl (Mettler Toledo, Oakland, USA; Nr. GP-L1000F) 10µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.213) 200µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.211) 1.000µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.762.211)
Deckglas	12mm Ø (Marienfeld Lab. Glassware Lauda-Königshofen; Nr. 011152)

Kanülen	0,4×12mm (Braun, Melsungen)
	0,45×12mm (Braun, Melsungen)
	0,6×30mm (Braun, Melsungen)
MACS Säulen und Zubehör	MS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-201)
	LS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-401)
	<i>Pre-Separation Filters</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-041-407)
Mikrotiterplatten	96- <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 655180)
	96- <i>Well</i> -Rundbodenplatten (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 650180)
Probenröhrchen steril	0,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710051)
	1,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710052)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.690)
	2ml <i>Safe Seal</i> (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5ml <i>Safe Lock</i> (Eppendorf, Hamburg; Nr. 35325)
	0,2ml MicroAmp ^R mit Deckel (Applied Biosystems, Foster, USA; Nr. N801-0840)
	0,2ml MicroAmp ^R Optical Tubes ohne Deckel (Applied Biosystems, Foster City, USA; Nr. N801-0933)
	Optical Caps (8 Caps/strip) MicroAmp ^R (Applied Biosystems, Foster City, USA; Nr. N801-0935)
Skalpelle	Einmalskalpelle, Aesculap AG, Tuttlingen
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,2µm (VWR, Darmstadt; Nr. 514-0061)
	Spritzenvorsatzfilter 0,45µm (Qualilab, Merck, Bruchsal; Nr. 5122111)
	150ml Easy Flow TM Filter 0,22µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 357107)
	250ml Stericup Express Plus 0,22µm (Millipore, Schwalbach)

Zellkulturplatten	6-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046) 24-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353047) 48-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353004) 100/20mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353003) 150/25mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025)
Zellnylonsieb	40µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352340) 100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096) 50ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070) 13ml für BAC Aufreinigung, 95×16,8mm, PP (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 55.518) 36ml für UZ, PP (Sorvall, (Langenselbold; Nr. 03141)

2.1.3 Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden in erster Linie VE-Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$, Millipore, Molsheim, Frankreich), bei bestimmten Ansätzen allerdings auch *Aqua bidest* (*Aqua ad iniectabilia*, Braun Melsungen) verwendet.

Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole)	BD Bioscience, Heidelberg
Agarose (SeaKem LE)	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ampicillin (Amp)	Roth, Karlsruhe

Bacto Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol (Cam)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Desoxiribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Längenstandard	1kbp Leiter, Invitrogen, Karlsruhe
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Essigsäure 100% (v/v) (HAc)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetra-essigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd säurefrei 37% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Formalin 37% (v/v) für Histologie	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Hepes	Serva, Heidelberg
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Karlsruhe
Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
2-Mercaptoethanol (β -ME)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylzellulose	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Mowiol® 4-88 Reagent	Merck, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe

Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PolyFect	Qiagen, Hilden
Salzsäure (HCl) 25%	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
TrisBase	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
Xylol	Merck, Darmstadt
Yeast extract Servabacter	Serva, Heidelberg

2.1.4 Kits

Zytofix/Zytoperm Kit	BD Bioscience, Heidelberg; Nr. 554714
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim; Nr. 11732668001
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, Mannheim; Nr. 11858874001
Peroxidase VECTASTAIN ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA; Nr. PK-4000
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden; Nr. 28704
Qiagen PCR-Cloning Kit	Qiagen, Hilden; Nr. 231124
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden; Nr. 27106
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden; Nr. 12163
QIFIKIT	Dako, Hamburg; Nr. K0078

2.1.5 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen erfolgten bei den vom jeweiligen Hersteller angegebenen Temperaturen und mit den mitgelieferten Puffern.

<i>Calf Intestinal Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main; Nr. M0290L
HotStar <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 203203
ProofStart DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 202205
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim; Nr. 03115836001
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt/Main
RNase (DNase frei)	QIAGEN, Hilden; Nr. 19101
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, Nr. 15224-041
<i>Taq</i> DNA-Polymerasen	QIAGEN, Hilden; Nr. 201203

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden als Lyophilisate (entsalzt) von den Firmen Metabion (Martinsried) oder Operon Biotechnologies (Köln) bezogen. Eine Aufreinigung über HPLC erfolgte nur für sehr lange Oligonukleotide oder *TaqMan*-Sonden. Nach Lieferung wurden die Oligonukleotide in sterilem *Aqua bidest* oder Tris Puffer pH8,0 gelöst und als Stock bei -20°C gelagert.

Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgten nach Rawlinson et al., 1996 (GenBank Accession No.: NC_004065).

Primer zum Nachweis von m164/gp36,5

m164_Sonde_for	223.261-223.281	5'-AAC AAG ATC TAT CCC GAC CAG-3'
m164_Sonde_rev	222.415-222.435	5'-TGG CTG ATG GT TGCG CGA CAC-3'

Sequenzier-Oligonukleotide für m164/gp36,5

m164_seq_for	223.037-223.016	5'-GTG TGC GAC ATC GAC CAT GTG-3'
m164_seq_rev	222.581-222.601	5'-GCT CCA ACT GAC AGT CGC AGC-3'

PCR-Oligonukleotide für die gerichtete PCR-Mutagenese mittels Kombinations-PCR

(fett: orthotoper Peptidaustausch)

m164_mut_for 223.745-223.721

5'-CCT GAC CGG CGA TCT GCT GGT CCC G-3'

m164_mut_rev 222.376-222.400

5'-CGT CCG ACG CGC GAC GAA GCG TTC G-3'

m164-SIINFEKL_mut_for 222.835-222855

5'-**AGT ATA ATC AAC TTT GAA AAA GCG** TTC TGG GCC GTC AAC AAC CAG-3'

m164-SIINFEKL_mut_rev 222.883 -222.902

5'-**CGC TTT TTC AAA GTT GAT TAT ACT** GTC AGC GCC CCA CGT CCG AC-3'

m164-SIINFEKA_mut_for 222.835-222855

5'-**AGT ATA ATC AAC TTT GAA AAA CTG** TTC TGG GCC GTC AAC AAC CAG-3'

m164-SIINFEKA_mut_rev 222.883 -222.902

5'-**CAG TTT TTC AAA GTT GAT TAT ACT** GTC AGC GCC CCA CGT CCG AC-3'PCR vermittelte Klonierung von pDrive qB PTHrP BAC

(fett: eingefügte Schnittstelle)

BAC_qPCR_Apa_for 5'-ATA TAT **GGG CCC** GCC GTA ATA TCC AGC TGA AC-3'BAC_qPCR_Apa_rev 5'-ATA TAT **GGG CCC** CCG TGG ATA AGT GGA TAA CC-3'Primer/Sonden Paar zur *TaqMan*-Quantifizierung von BAC-Sequenzen,

BAC_taq_for 5'-GTT CTG TCA TGA TGC CTG CAA-3'

BAC_taq_rev 5'-AAT CCG CTC CAC TTC AAC GT-3'

Sonde BAC_taq

5'-[6~FAM]CAC CGC ACG AAG ATT TCT ATT GTT CCT GA[TAMRA~6~FAM]

Primer/Sonden Paar zur *TaqMan*-Quantifizierung von M55/qB

gB_Taq_For 83.137-83.156 5'-CTA GCT GTT TTA ACG CGC GG-3'

gB_Taq_Rev 83.227-83.207 5'-GGT AAG GCG TGG ACT AGC GAT-3'

Sonde gB_Taq 83.175-83.200

5'-[6~FAM]TGC TCG GTG TAG GTC CTC TCC AAG CC[TAMRA~6~FAM]-3'

2.1.7 Antigene Peptide

Die synthetischen Peptide wurden als Lyophilisate (ca. 1mg/Peptid, Reinheit > 75%) von der Firma JERINI Bio Tools GmbH (Berlin) bezogen, in 30% (v/v) Acetonitril in PBS mit einer Konzentration von 10^{-3} M gelöst und bei -70°C gelagert. Alle weiteren Verdünnungen wurden mit PBS durchgeführt.

Tab. 2: Liste der verwendeten antigenen Peptide

ORF / Name	Peptid-Sequenz	MHC-Klasse-I-Restriktion	Referenz
<i>M38</i>	³¹⁶ SSPPMFRV ³²³	K ^b	Munks et al., 2006a, b
<i>M45</i>	⁹⁸⁵ HGIRNASFI ⁹⁹³	D ^b	Munks et al., 2006a, b
<i>M57</i>	⁸¹⁶ SCLEFWQRV ⁸²⁴	K ^b	Munks et al., 2006b
<i>M122</i>	⁴¹⁶ RALEYKNL ⁴²³	K ^b	Munks et al., 2006a
<i>m139</i>	⁴¹⁹ TVYGFCLL ⁴²⁶	K ^b	Munks et al., 2006a, b
<i>m141</i>	¹⁶ VIDAFSRL ²³	K ^b	Munks et al., 2006a, b
<i>m164</i>	¹⁶⁰ WAVNNQIAV ¹⁶⁸	D ^b	Munks et al., 2006b
<i>m164</i>	¹⁵⁰ AGPPRYSRI ¹⁵⁸	D ^d	Holtappels et al., 2002a; b
<i>OT-1</i>	²⁵⁷ SIINFEKL ²⁶⁴	K ^b	Rötzschke et al., 1991

2.1.8 Antikörper

Die hier in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurde für Western Blot Analysen(WB), Immunfluoreszenzfärbungen (IF), Immunohistochemie (IC) und im für Analysen im Zytrofluorometer(FACS) verwendet.

Tab. 3: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Typ und Klon	Immunisierte Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Primäre Antikörper</i>				
α -CD16/CD32 (Fc γ III/II Receptor)	2.4G2	Maus	FACS 1:100	BD Pharmingen 553142
α -D ^b	CTDb PE	Maus	FACS 1:100	Invitrogen MM3804
α -IE1	Croma101	Maus	IHC 1:200	Dr. Stipan Jonjic University of Rijeka, Croatia
α -K ^b	AFG6-885	Maus	FACS 1:100	BD Pharmingen 553567
α -K ^b	CTKb PE	Maus	FACS 1:100	Invitrogen MM3604
α -K ^b /SIINFEKL	25.D1-16	Maus	FACS 1:50 IF 1:40	Dr. Hansjörg Schild Inst. für Immunologie Universität Mainz
α -m164	pAk	Kaninchen	FACS 1:100 IF 1:200 WB 1:2000	Dr. Dennis Strand I. Med. Klinik Universität Mainz
α -MHC II	M5/114.15-82 FITC	Maus	FACS 1:100	eBioscience 11-5321-82
α -pp65	C10; C11	Maus	FACS 1:50	Biotest 812 600
<i>Sekundäre Antikörper</i>				
α -Kaninchen	AF546	Ziege	FACS 1:100 IF 1:200	MoBiTec, A11010
α -Kaninchen	POD	Schwein	WB 1:1000	DAKO, P0217
α -Kaninchen	AF488	Ziege	FACS 1:100 IF 1:200	MoBiTec, A11008
α -Maus	AF546	Ziege	FACS 1:100 IF 1:200	MoBiTec, A11003
α -Maus	AF488	Ziege	FACS 1:100 IF 1:200	MoBiTec, A11001
α -Maus	F(ab) ₂	Ziege	FACS 1:100	DAKO, F0479
α -Maus	biotinyliertes F(ab) ₂	Ziege	IHC 1:100	Sigma-Aldrich B0529
<i>sonstiges</i>				
CD8a (Ly-2) MicroBeads	--	--	--	Miltenyi Biotec 130-049-401

2.2 Viren

mCMV (WT-mCMV): Infektion von Zellkulturen und Versuchstieren erfolgte mit dem Laborstamm des murinen Cytomegalovirus (mCMV, *Smith strain*, Smith, 1954; 1956; ATCC VR-194; neue Bezeichnung VR-1399). Ausgehend von diesem Virusstamm konnte das gesamte mCMV-Genom sequenziert werden (Rawlinson et al., 1996). Eine experimentelle Bestätigung der vorhergesagten ORFs erfolgte von Tang et al. (2006).

MW97.01 (mCMV-BAC-WT): Die chimäre mCMV-Rekombinante wurde aus dem Genom des Laborstammes ATCC VR-1399 sowie einem Anteil (*Hind*III-E-Fragment) des mCMV-Laborstammes K181 generiert. Nach der Klonierung des chimären mCMV-Genoms in ein *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) und anschließender Transfektion in murine embryofetale Fibroblasten (MEF) konnte aus dem Überstand das rekonstituierte Virus MW97.01 isoliert werden (Wagner et al., 1999). MW97.01 zeigte *in vivo* keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften zu WT-mCMV Smith (Wagner et al., 1999). mCMV-BAC-WT wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

mCMV-Δm06/Δm152: Diese Deletionsmutante der Immunevasionsgene *m06* und *m152* wurde von M. Wagner erstellt (Wagner et al., 2002) und uns freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

Rekombinante mCMV, die in dieser Arbeit mittels BAC-Mutagenese generiert wurden:

mCMV-m164-SIINFEKL	(Epitop-Mutante)
mCMV-m164-SIINFEKA	(Epitopverlust-Mutante)
mCMV-Δm06/Δm152/m164-SIINFEKL	(Epitop-Mutante)
mCMV-Δm06/Δm152/m164-SIINFEKA	(Epitopverlust-Mutante)

Zur Beschreibung siehe 4.4

2.3 Bakterien

Der überwiegende Teil der molekularbiologischen Arbeiten erfolgte in *E. coli* des Stamms DH10B. Insbesondere wurden Manipulationen des mCMV-BAC-WT-Plasmids (C3X) in diesem Stamm ausgeführt, da sich dieser als besonders geeignet für Transformation und Propagierung von großen bis sehr großen DNA Fragmenten gezeigt hat.

DH10B F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG

2.4 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der klinisch-theoretischen Institute der Universität Mainz unter SPF (*specified pathogen free*) Bedingungen gezüchtet. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse der murinen Inzuchtstämme C57BL/6J des Haplotyps H-2^b (kodierend für die MHC-Klasse-I-Moleküle K^b und D^b) und BALB/cJ des Haplotyps H-2^d (kodierend für die MHC-Klasse-I-Moleküle K^d, D^d und L^d) verwendet. Die Genehmigungsnummer der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz für alle tierexperimentellen Arbeiten lautete 1.5177-07-04/051-61.

2.5 Materialien für die Zellkultur

Alle aufgeführten Medien, Zusätze und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit *aqua bidest.* angesetzt und bei Bedarf über einen 0,2 μ m Membranfilter sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C.

2.5.1 Reagenzien und Medienzusätze

Amphotericin B: Amphotericin B ist ein Antimycotikum, das zur Vorbeugung und Behandlung von Pilzinfektionen dient. Es wurde in einer Konzentration von 1,4 μ g/ml dem Medium zugesetzt.

⁵¹Cr-Natrium-Chromat (Na₂[⁵¹Cr]O₄): Das zur radioaktiven Markierung von lebenden Zellen eingesetzte Radionuklid (Amersham Buchler, Braunschweig) wurde in NaCl-Lösung im Abstand von drei bis vier Wochen bezogen und bei 4°C gelagert.

Aktivität:	2 mCi/ml
Spezifische Aktivität:	350-500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
Halbwertszeit:	27,7 Tage

Fötale Kälberserum (FCS): Steriles und auf Mycoplasmen getestetes FCS der Firma PAA Laboratories (Cölbe) diente als Zusatz für Zellkulturmedien. Die Lagerung des FCS erfolgte bei -20°C . Vor Gebrauch wurde es bei 4°C aufgetaut und anschließend für 30min bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung inkubiert. Das inaktivierte FCS wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

HEPES: Der im physiologischen pH-Bereich wirksame Puffer (Serva, Heidelberg) sorgt für eine verbesserte Pufferung und pH-Stabilität bei schnell wachsenden Kulturen mit starker Ansäuerung des Mediums.

Für die Herstellung einer 1M Stocklösung ($238,3\text{g/mol}$) wurden $119,15\text{g}$ in etwa 300ml *aqua bidest.* gelöst, der pH7.2 mit ca. 32ml 5M NaOH eingestellt, auf 500ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Methylzellulose: Zum Überschichten von infizierten Zellkulturen bei der Bestimmung von Virustitern diente Methylzellulose. $8,8\text{g}$ Methylzellulose (Fluka, Buchs, Schweiz) wurden in 360ml *aqua bidest.* mit einem Magnetrührer suspendiert, autoklaviert und bei 4°C üN unter Rühren gelöst.

Nach Zugabe von 40ml $10\times\text{MEM}$, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, $0,1\text{mg/ml}$ Streptomycin, 5% (v/v) FCS und Einstellen des pH-Wertes auf pH7,5 mit NaHCO_3 (Stocklösung 55g/l) war das Medium gebrauchsfertig. Die Lagerung erfolgte bei 4°C .

β -Mercaptoethanol (2-ME): Dieses Reduktionsmittel (Sigma, Deisenhofen) wurde den Kulturmedien als Oxidationsschutz der Inhaltsstoffe zugesetzt. Dazu diente eine Lösung von $100\mu\text{l}/100\text{ml}$ in *aqua bidest.* Sie wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden 500ml Kulturmedium $1,75\text{ml}$ 2-ME zugesetzt (Endkonzentration: $5\times 10^{-5}\text{M}$). Die aufgetaute Lösung ist bei 4°C begrenzt lagerfähig.

PolyFect: Dieses Transfektions-Reagens (Qiagen, Hilden) ist ein polykationisches Dendrimer, das DNA bindet und mit dieser zu einer kompakten sphärischen Struktur kondensiert. Diese Kondensate werden von der Zelle per Phagozytose aufgenommen und die DNA im Zytoplasma freigesetzt.

Phosphonoacetic acid (PAA): PAA ist ein Inhibitor der herpesviralen DNA-Polymerase und wurde zur Generierung von *Early*-Phase-Zielzellen verwendet. Eine Stocklösung von 50mg/ml wurde in *aqua bidest.* angesetzt, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20°C gelagert. PAA wird in einer Verdünnung von $5\mu\text{l/ml}$ eingesetzt (Endkonzentration: $250\mu\text{g/ml}$).

PBS-Puffer Dulbecco (*Phosphate Buffered Saline*): Gibco, Nr. 14190

140mM	NaCl
2,7mM	KCl
6,5mM	Na ₂ PO ₄
1,5mM	KH ₂ PO ₄ , (pH 7,4)

Penicillin/Streptomycin: Als Antibiotika-Prophylaxe gegen grampositive und gramnegative Bakterien wurden Penicillin/Streptomycin in Kombination eingesetzt. Eine Stocklösung, bestehend aus 10.000U Penicillin und 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl wurde von PAA Laboratories (Nr. P11-010) bezogen. Die Stocklösung wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem Kulturmedium zugesetzt.

(Endkonzentration: 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin).

TÜRK's Lösung: Die Lösung diente zum Anfärben der Zellkerne mononukleärer Zellen bei gleichzeitiger Hämolyse der Erythrozyten durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure.

Trypanblau (Biochrom, Nr. L6323): Eine Gebrauchslösung dieses Vitalfarbstoffs (0,1% (w/v), in PBS) wurde zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen verwendet.

Trypsin/EDTA: Die zum Ablösen von adhärenenten Zellen verwendete Lösung (PAA Laboratories Nr. L11-003) wurde 1:10 mit PBS verdünnt eingesetzt.

(Endkonzentration: 0,5g/l Trypsin; 0,2g/l EDTA, pH7,4-7,6)

2.5.2 Zytokine

Interferon- γ (IFN γ): IFN γ wird von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert. Es sorgt für die Regulation unterschiedlicher Immun- und Entzündungsprozesse, wie Rekrutierung von Lymphozyten und Stimulation von Macrophagen (Dijkmans & Billiau, 1988; De Maeyer & De Maeyer-Guignard 1992).

Rekombinantes murines IFN γ wurde von R&D Systems (Wiesbaden, Nr. 485-MI-100) bezogen und mit einer Konzentration von 1ng/ml zu Vorbehandlung von MEF und BMDCs in der Zellkultur eingesetzt.

Interleukin-2 (IL-2): IL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der die Proliferation von Antigen- bzw. Lektin-stimulierten T-Zellen (Smith, 1984; 1988b) unterstützt.

Rekombinantes humanes IL-2 (rhIL-2) (lot.89050/84802) mit einer spezifischen Aktivität von 7.3×10^6 U/mg wurde in einer Konzentration von 100U/ml (0.88pmol) während der Kultivierung von T-Zelllinien eingesetzt. Das Zytokin wurde freundlicherweise vom San- doz Forschungsinstitut, Wien, zur Verfügung gestellt.

2.5.3 Zellkulturmedien

Die Grundmedien wurden steril von der Firma Gibco-BRL (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen und mit den unter 2.5.1 aufgeführten Zusätzen supplementiert. Alle Medien enthalten L-Glutamin. Spezielle Medienzusätze sind bei der Aufführung der einzelnen Zellen angegeben.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Nr. 61965-026)

10% (v/v)	FCS
2mM	L-Glutamin
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin

MEM (*Minimum Essential Medium*): Nr. 31095-029

10% (v/v)	FCS
2mM	L-Glutamin
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin

MEM 10× (*Minimum Essential Medium*): Nr. 21430-020

Zehnfachkonzentriertes Medium zum Ansetzen von Methylcellulose

MEM ALPHA (*Minimum Essential Medium*): Nr. 22561-021

10% (v/v)	FCS
2mM	L-Glutamin
10mM	HEPES
5×10^{-5} M	β -Mercaptoethanol
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*): Nr. 31870-025

10% (v/v)	FCS
2mM	L-Glutamin
10mM	HEPES
5×10^{-5} M	β -Mercaptoethanol
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin

2.5.4 Primäre Zellen und Zelllinien

MEF (Murine Embryofetale Fibroblasten): Diese primären Zellen (siehe 3.1.3) wurden, bis einschließlich der 3. Passage, zur mCMV-Produktion und für Infektions-Studien verwendet. Die Permissivität dieser Zellen für mCMV ist hoch und die Plaquebildung gut sichtbar. Auch zur Rekonstitution rekombinanter Viren nach Transfektion von mCMV-BAC-DNA wurden MEF verwendet.

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

145-2C11: Diese Hybridom-Zelllinie exprimiert anti-CD3 ϵ mAb und diente im *ELISpot*-Assay zur polyklonalen Stimulation von CD8 T-Zellen. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Bluestone, UCSF, *Department of Microbiology and Immunology*, San Francisco, CA, USA, zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium:

RPMI + 10% (v/v) FCS

EL-4: Bei den EL-4 Zellen handelt es sich um eine Suspensionszelllinie, die aus einem T-Zell-Lymphom der Maus (C57BL/6N) stammt. Sie wurden im Zytolysetest als APC für H-2^b präsentierte Peptide eingesetzt.

Kulturmedium:

DMEM + 10% FCS

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Luftkeimen (Pilzsporen, Bakterien) an einer Steril-Werkbank, unter Verwendung steriler Glas- und Plastikwaren, ausgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CO₂-Inkubatoren (37°C, 5% CO₂ (v/v)) unter gesättigter Wasserdampfatmosfera (95% (v/v) relative Luftfeuchte). Bei diesen Bedingungen ist die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes der CO₃²⁻/HCO₃⁻-gepufferten Medien sichergestellt.

3.1.1 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen (Kryokonservierung) erfolgt bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Der Zusatz von DMSO verhindert aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften Zellschädigungen durch Eiskristallbildung während des Einfrierens.

Zur dauerhaften Lagerung wurden zuvor pelletierte Zellen mit einer Zellzahl von 1-5×10⁶/ml in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und in 1ml Aliquots in eisgekühlte Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte das langsame Einfrieren bei -70°C in einer isolierenden Umhüllung (Zellstoff). Nach 24h wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie über Jahre ohne Vitalitätsverlust gelagert werden können.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen unverzüglich bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit Kulturmedium gewaschen (ca. 50ml, zur Entfernung des zytotoxischen DMSO), in frischem Medium resuspendiert und in die Kulturgefäße aufgeteilt.

Einfriermedium:

90% (v/v)	FCS
10% (v/v)	DMSO

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Färbung mit Trypanblau oder TÜRK's Lösung. Der Vitalfarbstoff Trypanblau dient durch Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen als Marker zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Lebende Zellen sind für wenige Minuten für den Farbstoff impermeabel, wogegen tote Zellen ihn sofort aufnehmen.

Zur Bestimmung von Leukozytenzahlen in mit Erythrozyten verunreinigten Proben wurde eine Färbung mit TÜRK's Lösung verwandt. Dabei lysiert die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure die Erythrozyten und kernhaltige Zellen, wie Leukozyten, werden durch Methylviolett angefärbt.

Für die Ermittlung von Zellzahlen wurde ein Aliquot der Zellen in geeigneter Konzentration mit dem entsprechenden Farbstoff gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nach dem Auszählen von vier Großquadraten wird die Zellzahl wie folgt bestimmt:

$$ZZ/ml = N/n \times V \times 10^4$$

ZZ: Zellzahl, N: Zahl der gezählten Zellen, n: Zahl der ausgezählten Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10^4 : Kammerfaktor

3.1.3 Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten

Die Präparation primärer Fibroblasten erfolgte aus 14-17 Tage alten murinen Embryonen über Auflösung der Gewebestruktur und anschließender Kultivierung der adhärennten Zellen. Für ein genaues Protokoll siehe Podlech et al., 2002. Die so gewonnenen Fibroblasten werden im Anschluss weggefroren oder in Kultur genommen. Um vergleichbare Bedingungen für Infektion und Infektionsverlauf zu gewährleisten, wurden MEF für alle Experimente nur bis zur 3. Passage verwendet.

Trypsin/EDTA pH6,4:

1,25g	Trypsin
1,25g	EDTA×2H ₂ O
	ad PBS 1000ml

mit NaOH auf pH6,4 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

Kulturmedium:

MEM + 10% FCS

Einfriermedium:

siehe 3.1.1

3.1.4 Transfektion von BAC-Plasmid-DNA

Die Rekonstitution rekombinanter mCMVs erfolgte über Transfektion von aufgereinigter BAC-DNA mit Hilfe des PolyFect-Reagenz. Zu 70% konfluente MEF wurden mit unterschiedlichen Volumina (5, 10, 15 bzw. 20µl) gereinigter BAC-DNA (siehe 3.5.10.7) transfiziert. Je *Well* einer 6-*Well* Platte wurde ein entsprechendes Volumen BAC-DNA mit MEM ohne Zusätze auf 100µl Gesamtvolumen eingestellt, vorsichtig durch invertieren gemischt und mit 10µl PolyFect-Reagenz versetzt. Die Bildung der DNA-Komplexe erfolgte während einer 10minütigen Inkubation bei 20-22°C.

Die MEF wurden in der Zwischenzeit mit 2ml 1×PBS gewaschen und mit 1,5ml Kulturmedium überschichtet. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz mit 600µl Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach 6-8h Inkubation bei 37°C wurde der Transfektionsansatz von den Zellen genommen, diese mit 3ml frischem Kulturmedium überschichtet und die Zellen weiterhin bei 37°C inkubiert.

4-6 Tage nach erfolgreicher Transfektion treten die ersten Plaques auf, die Überstände wurden nach vollständiger Lyse des Zellrasens einzeln abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (5min; 500×g; Heraeus Labofuge 400R; 4°C). Die Virusüberstände können zur Entfernung der BAC-Sequenz (siehe 3.2.4) weiter passagiert oder bei -70°C gelagert werden.

Kulturmedium:

MEM ohne Zusätze

MEM + 10% FCS

3.1.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen wurde in jedes *Well* einer 24-*Well*-Platten ein steriles Deckgläschen gelegt und MEF ausgesät. Diese wurden zentrifugal infiziert (siehe 3.2.3) und nach 6-8h p.i. fixiert. Als Fixans diente eiskalter 70%iger Methanol (90min; 4°C) oder 4% PFA (10min, 20-22°C). Anschließend wurde das Fixans abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Fixierte Zellen können in PBS bei 4°C für 10 bis 14 Tage gelagert werden.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Deckgläschen mit den fixierten Zellen zunächst 3×5min mit PBS gewaschen und anschließend für 20min mit 50µl Blockierungspuffer inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten, um ein austrocknen der Präparate zu verhindern, in einer feuchten Kammer bei 20-22°C. Das im Blockierungspuffer enthaltene Triton X-100 sorgt gleichzeitig für die Permeabilisierung der Zellen. Im Anschluss erfolgte für 1-2h die Inkubation mit 50µl Primärantikörper verdünnt in Blockierungspuffer. Ungebun-

dener Primärantikörper wurde während dreier Waschschrte (3×5min) in PBS entfernt. Der Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper wurde für 5min bei 6.000×g zentrifugiert, um Farbstoffkomplexe abzutrennen, und anschließend 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt. Um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern, erfolgten alle weiteren Inkubationen im Dunkeln. Die Zellen wurden mit 50µl Sekundärantikörperverdünnung für 1-2h inkubiert und dann wiederum 3×5min in PBS gewaschen. Ein Gegenfärben des Zellkerns ist durch eine 5 minütige Inkubation mit 50µl Hoechst 33342 Lösung (1:10⁴ in PBS) möglich. Nach dem Waschen mit PBS (4×5min) erfolgte das Eindecken der Deckgläschen mit *Mounting Medium* oder Mowiol. Bei Doppelimmun-Fluoreszenzen wurden Primärantikörper unterschiedlicher Spezies gemeinsam verwendet. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie.

4% (w/v) PFA:

4%	PFA
4%	Saccharose
	ad PBS

70% (v/v) Methanol:

ad. PBS

Blockierungspuffer:

15%	FCS
0,1%	Triton X-100
	ad PBS

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 mCMV-Produktion

Die Generierung hochreiner mCMV-Stocks erfolgte aus infizierten MEF der 3. Passage nach dem in Podlech et al., 2002 beschriebenen Protokoll.

Hierzu wurden maximal 55 Zellkulturschalen (Ø 14,5cm) mit 1×10⁵pfu mCMV je Schale bei 20-22°C für 30min infiziert und für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt der maximalen Infektion (ca. 80% der Zellen sind abgekugelt und befinden sich im Überstand) wurden die Überstände und die noch adhärenente Zellen abgenommen und gesammelt. Im Anschluss erfolgten Zellaufschluss und Pelletierung der Virionen durch Zentrifugation (3h; 28.000×g; 4°C, RC 5C Plus; Rotor SLA-1500). Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt über ein 15%iges Saccharose/VSP-Kissen (1h; 52800×g; 4°C; Sorvall

Combi Plus; Rotor AH-629) konnte das aufgereinigte Virus in 15%iger Saccharose/VSP-Lösung aliquotiert und bei -70°C gelagert werden.

Gereinigtes Virus kann bis zu dreimal aufgetaut werden, ohne dass der Virustiter signifikant abnimmt. Virusverdünnungen sollten dagegen nicht wieder eingefroren werden.

Kulturmedium:

MEM + 10% FCS

Virus Standard Puffer (VSP):

50mM	Tris
5mM	EDTA×2H ₂ O
12mM	KCl

Lösung mit HCl auf pH 7,8 einstellen und anschließend autoklavieren.

VSP + 15% (w/v) Saccharose:

15% (w/v) Saccharose in VSP

im Anschluss die Lösung sterilfiltrieren, bei 4°C 2-3 Tage haltbar.

3.2.2 mCMV-Virustiter Bestimmung

Der mCMV-Virustiter wird als *plaque-forming-unit* (pfu) angegeben. Eine pfu ist nach Definition die Menge an Virus, die benötigt wird, um einen einzelnen Plaque in einem Monolayer permissiver Zellen zu erzeugen. Die Berechnung erfolgt über folgende Formel:
Virustiter (pfu/ml) = Plaquezahl×V (V: Verdünnungsfaktor)

3.2.2.1 Virustiter-Bestimmung aus Überständen

Zur Virustiter-Bestimmung wurden MEF der 3. Passage auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit je 100µl/Well einer log₁₀ Verdünnungsreihe der zu titrierenden Viruslösung infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte ein Überschichten mit 500µl Methycellulose, um die Diffusion von freigesetzten Virionen zu erschweren. 4-5 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Plaques im Invertmikroskop gezählt und der Virustiter berechnet. Die Virustiter-Bestimmung erfolgte in Triplikaten und in zwei unabhängigen Wiederholungen. Der genaue experimentelle Ablauf ist Podlech et al., 2002 zu entnehmen.

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

Methylzellulose-Medium:

(siehe 2.5.1)

3.2.2.2 Virustiter-Bestimmung aus Organhomogenaten

Die Virustiter-Bestimmung erfolgte auf MEF der 3. Passage, die auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät worden waren. Je Platte können 4 Organe als Duplikate titriert werden. Hierzu wurden die entnommene Organe (siehe 3.3.3) bei 37°C rasch aufgetaut und das Einfriermedium verworfen. Anschließend wurde das Organ über einem sterilen Metallsieb homogenisiert, das Sieb mit 2ml Medium gespült und eine \log_{10} Verdünnungsreihe (6 Verdünnungsstufen) erstellt. Von dieser wurden 100µl je Well auf die zuvor mit PBS gewaschenen MEF gegeben und zentrifugal infiziert (siehe 3.2.3). Die Auswertung erfolgte nach 4 Tagen durch Auszählen der Plaques im Invertmikroskop und Berechnung des Organtiters als pfu/Organ (siehe auch Podlech et al., 2002).

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

3.2.3 Zentrifugale Infektion von MEF

Die Infektion permissiver Zellen mit mCMV kann durch Zentrifugation um einen Faktor von ca. 20 verstärkt werden (Osborn & Walker 1968; Hodgkin et al., 1988; Kurz et al., 1997; Podlech et al., 2002).

Für die zentrifugale Infektion wurden MEF der 2. oder 3. Passage in 6-Well Zellkulturplatten oder Zellkulturschalen (Ø10cm) ausgesät. Vor der Infektion wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe der Viruslösung für 5min bei 760×g (Multifuge 3 S-R) zentrifugiert. Danach wurden die Platten um 180° gedreht und für weitere 25min bei 760×g zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten mit Medium supplementiert oder mit Methylcellulose überschichtet.

Berechnung der benötigten Virusmenge für eine Infektion mit einer MOI von ~4:

$\text{Zellzahl} \times 0,2 \text{ pfu} = \text{benötigte pfu des Virusstocks}$

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

Methylzellulose-Medium:

(siehe 2.5.1)

3.2.4 Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV

Nach der Rekonstitution von rekombinanten mCMV aus BAC-DNA (siehe 3.1.4) ist es wichtig die im viralen Genom vorhandenen BAC-Vektor-Sequenzen zu entfernen. Diese können zu veränderten biologischen Eigenschaften der rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtyp führen (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001).

Im mCMV-BAC-Plasmid sind die BAC-Vektor-Sequenzen von homologen viralen Sequenzen flankiert und können über diese durch den eukaryotischen Rekombinations-Apparat mittels homologer Rekombination eliminiert werden. Daraus resultiert ein authentisches WT-mCMV-Genom frei von BAC-Vektor-Sequenzen (Wagner et al., 1999). Allerdings sind vier bis fünf Zellkultur-Passagen nötig, um eine weitestgehend BAC-DNA freie mCMV-Population zu erhalten.

Das Passagieren der Virusüberstände erfolgte in 6-Well-Zellkulturplatten durch wiederholte Infektion von MEF. Die Überstände wurden durch Zentrifugation (5min; 500×g; 4°C; Heraeus Labofuge 400R; Rotor 8172) von Zelltrümmern befreit und sub-konfluente MEF mit jeweils 1µl Viruslösung verdünnt in 999µl frischen Medium infiziert. Der restliche Überstand wurde als *Backup* bei -70°C gelagert.

Zur Infektion wurde das Kulturmedium der MEF abgesaugt, die Zellen mit 1ml Infektionslösung bedeckt und der Ansatz für ca. 30min bei 20-22°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Danach wurde mit jeweils 2ml Medium überschichtet und die Zellen für 4-5 Tage bei 37°C inkubiert bis der Zellrasen zu etwa 80% durchlysiert war. Dieses wurde für 3 Passagen wiederholt.

Das Inoculum der 4. Passage wurde mit 2ml Methylcellulose-Medium überschichtet, um nach 3-5 Tagen einzelne Virus-Plaques isolieren zu können. Einzeln lokalisierte Plaques wurden von der Unterseite der Kulturplatte markiert, dann wurden aus dem markierten Bereich mit sterilen, abgeschnittenen 1ml Pipettenspitzen einige Zellen mit Überstand gepickt und in 1ml Medium resuspendiert. Die weitere Infektion erfolgte wie oben beschrieben. Nach Lyse der Zellen wurde gleichfalls der Überstand abgenommen und auf 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eins dieser Aliquots dient zur Isolation viraler DNA (siehe 3.5.10.2), die anderen wurden als *Backup* bei -70°C gelagert.

Zur Überprüfung rekombinanter mCMVs auf eventuell noch verbleibende BAC-Sequenzen wurde eine quantitative *real-time* PCR (siehe 3.5.11.3) mit BAC-spezifischen Oligonukleotiden und Sonde durchgeführt. Wenn weniger als 10^3 BAC-Sequenzen pro 10^6 Virusgenome nachweisbar waren, wurde das jeweilige rekombinante mCMV als BAC-frei definiert.

Kulturmedium:

MEM + 10% (v/v) FCS

Infektionslösung:

1µl Virusüberstand + 999µl Medium

Methylcellulose-Medium:

(siehe 2.5.1)

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Intraplantare Infektion der C57BL/6 Maus

Ein hochtitriger mCMV-Virusstock wurde auf eine Konzentration von 2×10^5 pfu in 25µl PBS verdünnt. Durch Verluste während der Injektion betrug die tatsächliche Infektionsdosis bei Applikation von 25µl etwa 1×10^5 bis max. 2×10^5 pfu pro Tier. Das Virus wurde stets auf Eis gehalten und den Mäusen mit einer 1ml Spritze und Kanülen (0,4×19mm) intraplanter in die rechte Hinterpfote injiziert.

Immunsupprimierte Tiere zeigen nach etwa 7 Tagen eine deutliche Hämorrhagie und lokale Schwellung an der Hinterpfote. Dagegen ist bei immunkompetenten Tieren die Schwellung deutlich geringer oder kaum feststellbar.

3.3.2 Immunsuppression

Zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation rekombinanter mCMV wurden 8-10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse in einer Kleintierbestrahlungsanlage (OB58, mit zwei [^{137}Cs]-Strahlungsquellen, Buchler, Braunschweig) mit einer Dosis von 7Gy bestrahlt. Die Dosis musste monatlich entsprechend der Halbwertszeit von [^{137}Cs] ($T_{1/2}=30\text{a}$) und der Aktivität zum Zeitpunkt T_0 ($A_0=0,708 \text{ Gy/min}$) mit Hilfe des Zerfallsgesetzes ($A_t = A_0 e^{-\lambda t}$) neu berechnet werden. Die γ -Bestrahlung führt zu einer Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter et al., 1988).

3.3.3 Organentnahme und Probenkonservierung

Nach Tötung der Tiere mit CO_2 oder durch zervikale Dislokation wurden Milz, Lunge, Speicheldrüse und Leber entnommen und je nach Fragestellung weiter behandelt.

Organtiterbestimmung: Lagerung in Amphotericin B-haltigem Medium bei -70°C

Histologische Schnitte: Inkubation in Formalin üN, Weiterverarbeitung siehe 3.7.1.1

Kulturmedium:

MEM + Amphotericin B [1,4µg/ml]

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen fand in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) statt (Laemmli, 1970; Gallwitz et al., 1978). Hierbei wird das aufzutrennende Proteingemisch mit dem anionischen Detergenz SDS versetzt. SDS wird von den meisten Polypeptiden in einem konstanten Verhältnis gebunden. Jedes gebundene SDS-Molekül trägt eine zweifach negative Ladung zur Gesamtladung des Proteins bei, so dass sich SDS-Proteinkomplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit bilden. Sie wandern in der Gelelektrophorese annähernd ihrer Masse entsprechend Richtung im Polyacrylamid-Gel zur Anode. Standardmäßig wurde ein 10%iges Trenngel mit einem 4%igem Sammelgel verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit $\frac{1}{5}$ Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 4min erhitzt. Dies und der im Laemmli-Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol lösen Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf, so dass deren Einfluss auf das Wanderungsverhalten reduziert wird.

Tab. 4: Zusammensetzung des 4% Sammelgels und des 10% Trenngels.

	4% Sammelgel	10% Trenngel
Acrylamidlösung (30%)	1,5ml	6,00ml
4×Sammelgelpuffer	2,82ml	—
4×Trenngelpuffer	—	4,50ml
<i>Aqua dest.</i>	6,93ml	7,50ml
APS (10%)	150µl	144µl
TEMED	20µl	14,4µl

Das Einlaufen und Sammeln der Probenfront erfolgte bei einer Stromstärke von 2mA/cm, die bei Übertritt der Proben ins Trenngel auf 3,5mA/cm erhöht wurde. Nach Austritt der Probenpufferfront aus dem Trenngel wurde die Elektrophorese beendet. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurde parallel ein Proteinstandard mitgeführt.

4×Trenngelpuffer:

0,4%	SDS
1,5M	Tris/HCl [pH 8,8]

4×Sammelgelpuffer:

0,4%	SDS
0,5M	Tris/HCl [pH 8,8]

5×Elektrodenpuffer:

960mM	Glycin
0,5%	SDS
125mM	Tris/HCl [pH 8,3]

5×Laemmli-Probenpuffer:

1,5M	β-Mercaptoethanol
4%	SDS
20%	Glycerin
0,04%	Bromphenolblau
125mM	Tris/HCl [pH 6,8]

Acrylamid:

Rotiphorese®Gel30, Roth, Nr. 3029.1

10% APS:

In *aqua dest.*

TEMED:

(Roth, Nr. 2367.3)

Protein-Standard:

PageRulerTMPrestained Protein Ladder (Nr. SM0671)

3.4.2 Western Blot

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mittels *Semidry*-Blot auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Nr. IPVH00010) transferiert werden (Pluskal, 1986). Hierfür wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran und weitere drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere übereinandergeschichtet und die Proteine mit einer Stromstärke von $0,8\text{mA/cm}^2$ binnen 40min auf die Membran transferiert.

Transfer-Puffer:

39mM	Glycin
20%	Methanol
1,3mM	SDS
48mM	Tris/HCl [pH 9,2]

3.4.3 Immunfärbung des Western Blot-Signals

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit 7ml Verdünnung des Primärantikörpers. Dazu wurde die Membran in Folie eingeschweißt und üN bei 4°C auf einem Schütteltisch inkubiert.

Die Membran wurde fünfmal 10min mit Waschlösung 1 gewaschen und mit dem 1:10⁵ verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1h inkubiert. Nach dem Waschen mit Waschlösung 2 erfolgte die Darstellung der spezifischen Banden mit dem ECL Plus *Western Blotting Detecting Reagent* (Amersham Biosciences, Nr. RPN2132). Die über die Antikörper-gekoppelte Peroxidase vermittelte Reaktion zwischen Luminol und H₂O₂ emittiert Licht mit einem Emissionsmaximum bei 430nm, das auf einem Autoradiographiefilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche, Mannheim) detektiert werden kann.

Blockierungslösung:

5%	Magermilchpulver (MMP)
0,1%	Triton X-100
	ad PBS

Antikörperversdünnungslösung/Waschlösung 1:

1%	MMP
0,1%	Triton X-100 in PBS
	ad PBS

Waschlösung 2:

0,1% Triton X-100 in PBS

3.4.4 Proteinquantifizierung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Nr. 23225) verwendet. Dieser Assay beruht auf der Biuret-Reaktion; der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Cystein, Tryptophan und Tyrosin unter alkalischen Bedingungen. Die sich in der Lösung befindliche Bicinchonimin-Säure (BCA) chelatiert das entstehende Cu^+ und bildet einen farbigen Komplex mit Absorptionsmaximum bei 562nm. Die Absorption ist in einem Bereich von 20µg/ml bis 2mg/ml linear zur Proteinkonzentration (Smith et al., 1985) und kann einfach im Photometer gemessen werden.

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Vergleich mit einer BSA Standardreihe nach Herstellerangaben.

Herstellerprotokoll unter: <http://www.piercenet.com/files/1296as4.pdf>

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte standardmäßig spektrometrisch durch Messung der Extinktion bei 260nm im Photometer (BioPhotometer (Eppendorf) oder Nanodrop (PEQLAB)). Die minimal messbaren Volumina betrugen 50µl (BioPhotometer) bzw. 1µl Lösung (Nanodrop). Bei hohen DNA-Konzentrationen wurden die Lösungen in TE-Puffer oder 10mM Tris (pH8,0) verdünnt. Diese gepufferten Systeme sind Wasser vorzuziehen, da das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren in nichtgepufferten Lösungen stark variieren kann (Wilfinger et al., 1997).

Der Konzentrationsberechnung wurde folgender Wert zugrunde gelegt:

$$\text{Extinktion}_{260\text{nm}} = 1 \triangleq 50\mu\text{g/ml bei dsDNA}$$

Die Reinheit einer DNA-Probe von Proteinverunreinigungen lässt sich über den Extinktionsquotient der Extinktionen E_{260}/E_{280} bestimmen. Der Quotient gibt dabei das Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Protein an. Proteinfreie DNA Lösungen weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf, für RNA sollte der Quotient über 2,0 liegen (Sambrook & Russel, 2001).

3.5.2 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Für analytische Zwecke wurden 0,2-1,5µg Plasmid-DNA in 10-20µl Ansätzen mit Restriktionsenzymen verdaut. Standardmäßig wurde eine Enzymmenge von 5-20U je Ansatz in einem für die Aktivität des Enzyms geeigneten Puffer eingesetzt und für 2-16h bei enzymespezifischer Temperatur inkubiert. Mehrfachrestriktionen können bei übereinstimmenden Reaktionsbedingungen in einem Ansatz durchgeführt werden.

Präparative DNA Restriktionen, bei denen größere Mengen an DNA verdaut wurden (5-20µg in 20-100µl), erfolgten immer üN. Über eine Auftrennung der DNA im Agarose-Mini-Gel (siehe 3.5.3) kann der Erfolg der Restriktion kontrolliert werden.

Standard-Restriktionsansatz:

Plasmid-DNA	xµl
10×Reaktionspuffer	2µl
Restriktionsenzym(e)	yµl
H ₂ O _{reinst.}	ad 20µl

Nach der Restriktion erfolgte vor der Weiterverwendung der DNA immer eine Aufreinigung entweder über ein präparatives Gel (siehe 3.5.3) und Gel-Elution (siehe 3.5.4) oder über Säulenaufreinigung (siehe 3.5.5).

3.5.3 Native Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente können in Agarose-Gelen nach ihren Molekulargewichten elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen, Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, Intaktheits-Überprüfungen und präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren durchgeführt.

Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der DNA in 1%igen Agarose-Gelen. Für die Auftrennung von restringierten BAC-Plasmiden mit Fragmentgrößen zwischen 1 und 30kbp wurden 0,7%ige Agarose-Gele verwendet. In der Regel kamen so genannte Maxi-Gele (20×20cm bzw. 20×10cm) oder Mini-Gele (10×6,5cm) zum Einsatz. Die Mini-Gele wurden in erster Linie zur schnellen Kontrolle der DNA nach Restriktionen oder PCRs eingesetzt. Vor dem Gel-Lauf wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Vol. Probenpuffer versetzt, um das Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu ermöglichen. Die anschließende Trennung der Fragmente nach Molekulargröße erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern in 1×TAE. Die angelegte Spannung (0,5-5 V/cm Elektrodenabstand) richtet sich nach Fragment- bzw. Gelgröße. Die Auftrennung linearisierter BAC-DNA erfolgte üN in

speziellen Maxi-Gelen (20×25cm) bei 4°C (Gel-Herstellung siehe Gassen & Schrimpf, 1999) mit 1×TBE (höhere Pufferkapazität im Vergleich zu TAE) als Laufpuffer.

Um die DNA Banden beurteilen zu können wurde dem Gel Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1µg/ml) hinzugefügt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierendes Fluorophor das, mit UV-Licht angeregt, die DNA sichtbar macht.

Die Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe einer Sofortbild-Kamera (Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfilm Typ 667, UV-Filtersystem KodakWratten 2A) oder einer CCD-Kamera.

50×TAE-Puffer:

400mM	Tris
10mM	EDTA×2H ₂ O
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung mit Eisessig (ca. 285ml) auf pH8,0 einstellen und anschließend autoklavieren.

10×TBE-Puffer:

450mM	Tris
10mM	EDTA×2H ₂ O
450mM	Borsäure
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung mit Eisessig auf pH8,3 einstellen und anschließend autoklavieren.

10x Probenpuffer:

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
40% (w/v)	Saccharose

3.5.4 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte standardmäßig mit dem QIAquick Kit (Qiagen, Hilden). Die Extraktion und Reinigung von bis zu 10µg DNA mit einer Größe von 70bp-10kbp erfolgt ohne Phenolextraktion. Das Prinzip der Methode beruht auf einer quantitativen Adsorption von DNA-Molekülen an eine Silica-Gel-Membran unter Hochsalz-Bedingungen; die anschließende Elution der DNA erfolgt bei Niedrigsalz-Bedingungen mit 10mM TrisHCl (pH8,5).

Herstellerprotokoll unter: http://www1.qiagen.com/HB/QIAquickSpinKit_EN_1

3.5.5 Reinigung von DNA

Zur schnellen Aufreinigung von DNA, z. B. nach Restriktion oder zum Umpuffern, wurde der *High Pure PCR Purification Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. In Gegenwart von Guanidin-Thiocyanat bindet DNA selektiv an spezielle Glasfilter. Das folgende Waschen entfernt Oligonukleotide, Proteine und Salze aus dem Ansatz. Unter Niedrigsalzbedingungen erfolgt im Anschluss die Elution der DNA.

Versuchsprotokoll siehe: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1732668a.pdf>

3.5.6 Dephosphorylierung linearer DNA

Um die Religation eines restringierten Vektors zu verhindern, ist die Entfernung der terminalen Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA nötig. Dieses Vorgehen vermindert den Vektor-Hintergrund bei allen Klonierungen deutlich. Für die Dephosphorylierung von DNA steht die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) (NEB, Schwalbach) zu Verfügung. Dieses Enzym wurde den Herstellerempfehlungen entsprechend mit 0,5U pro µg DNA eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C ist für die vollständige Entfernung des Enzyms der Ansatz über ein präparatives Agarose-Gel (siehe 3.5.3 und 3.5.4) zu reinigen.

3.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Subklonierungen von DNA-Fragmenten ist es notwendig, freie DNA-Enden wieder zu verbinden. Diese Reaktion, d. h. Ausbildung einer Phospho-di-Ester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe einer dsDNA unter ATP Verbrauch wird von der T4 DNA-Ligase katalysiert.

Die für eine Ligation benötigte DNA-Menge ist direkt vom Größenverhältnis zwischen Vektor und Insert abhängig. Die benötigten DNA Mengen lassen sich über folgende Formel errechnen:

$$Masse_{Insert}[ng] = \frac{n \times Masse_{Vektor}[ng] \times Länge_{Insert}[bp]}{Länge_{Vektor}[bp]}$$

n = Verhältnis Insert zu Vektor

Für einen Ligationsansatz wurden zwischen 50 und 200ng linearisierte Vektor-DNA in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 zur Insert-DNA eingesetzt. Dieses gilt sowohl für *sticky-* als auch für *blunt-end* Ligationen. Für letztere erhöht die Zugabe von PEG die Reaktionswahrscheinlichkeit deutlich.

Ligationsansatz *sticky-end*

Vektor DNA	xµl
Insert DNA	yµl
10×T4 DNA Ligase Puffer	2µl
T4 DNA Ligase (1-2u)	0,2-0,4µl
H ₂ O _{reinst.}	auf 20µl

Ligationsansatz *blunt-end*

Vektor-DNA	xµl
Insert-DNA	yµl
10×T4 DNA Ligase Puffer	2µl
T4 DNA Ligase (1-2u)	1µl
PEG	2µl
H ₂ O _{reinst.}	auf 20µl

Die Ansätze wurden entweder für mindestens 16h bei 16°C oder für 2h bei 22°C inkubiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.5.10).

3.5.8 Bakterienanzucht**3.5.8.1 Flüssigkulturen**

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde immer nur von einer einzelnen Kolonie einer frischen Plattenkultur ausgegangen. Das Picken der Kolonie erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze, die dann in ein mit Medium gefülltes Kulturröhrchen (5ml LB-Medium für *high-copy* Plasmide bzw. 10ml LB-Medium bei *low-copy* Plasmiden z. B. BAC), evtl. mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, überführt wurde. Die Anzucht erfolgte üN bei geeigneter Temperatur (siehe 2.3) unter Schütteln (250U/min). Für größere Volumina (>10ml) wurde zuerst eine 5ml Vorkultur angeimpft und aus dieser nach 5-8h Inkubation ein größeres Volumen im Verhältnis 1:1000 angeimpft.

LB-Medium:

10g	NaCl
10g	Bacto-Trypton
5g	Hefeextrakt
	ad 1l H ₂ O _{demin}

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und anschließend autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin (Amp):	100mg/ml (in H ₂ O _{reinst.} ; 1:1000, c _{End} =100µg/ml)
Chloramphenicol (Cam):	34mg/ml (in Ethanol (100%); 1:2000, c _{End} =17µg/ml)
Kanamycin (Kan):	10mg/ml (in H ₂ O _{reinst.} ; 1:400, c _{End} =25µg/ml)

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und danach bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

3.5.8.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen sind sowohl dazu geeignet, Bakterien über einen begrenzten Zeitraum von max. 2 Wochen zu lagern, als auch dazu, Transformanten zu selektionieren oder Flüssigkulturen anzuimpfen. Der LB Agar wurde durch Aufkochen verflüssigt, auf 40-45°C abgekühlt, mit Antibiotika versetzt und anschließend in sterile Einweg-Plastikschalen gegossen. Nach der Polymerisierung konnten die Platten für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Die Plattenkulturen wurden je nach Anwendung mittels Verdünnungsausstrich oder flächig mit einem Drigalski-Spatel angelegt.

LB-Agar

10g	NaCl
10g	Bacto-Trypton
5g	Hefeextrakt
15g	Bacto-Agar
	ad 1l H ₂ O _{demin.}

3.5.8.3 Dauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienklonen wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 600µl einer frischen LB-Kultur in *CryoVials* überführt, mit 400µl 86%igem Glycerin gemischt und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

3.5.9 Transformation kompetenter Bakterienzellen

3.5.9.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Von einer frischen Plattenkultur wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 10ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum als Übernachtskultur angeimpft, die bei entsprechender Temperatur unter Schütteln wuchs. Am folgenden Tag wurden 100-500ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt 1:100 mit der Vorkultur überimpft und im Schüttelinkubator inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht wurde. Die Bakterien wurden nun 15min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4000×g und 4°C für 15min zentrifugiert (Sorvall RC5 Plus, Rotor SLA 3000). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlter 10%iger Glycerinlösung (v/v). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet dreimal in einem Kulturvolumen Glycerinlösung gewaschen. Das letztendlich erhaltene Pellet wurde in 1/100 Kulturvolumen Glyce-

rinlösung aufgenommen, in Aliquots à 50µl in Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren. Gelagert wurden die Zellen bei -70°C.

Glycerinlösung:

10% (v/v) Glycerin, vorgekühlt auf 4°C

3.5.9.2 Elektrotransformation

Ein Aliquot elektrokompenter Bakterien (3.5.9.1) wurde auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA gemischt. Dabei wurden maximal 2µl Ligationsansatz bzw. 1-5ng Plasmid DNA verwendet. Der Ansatz wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette (Ø 0,2cm) überführt und die Bakterien bei 2,5kV, 400Ω und 25mF perforiert (Gene Pulser, BIORAD, München). Im Anschluss wurde der Ansatz unmittelbar in 500µl LB-Medium aufgenommen und für 30-90min bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen.

3.5.9.3 Elektrotransformation von BAC-Plasmiden

Für die Transformation von BAC-Plasmiden wurde ein Protokoll von Swaminathan und Sharan (2004) modifiziert angewendet. Dabei ist zu beachten, dass sowohl die BAC-DNA (siehe 3.5.10.4) als auch die elektrokompenten Zellen möglichst frisch präpariert (siehe 3.5.9.1) sein sollten.

Für die Transformation wurden zwischen 1-3µl BAC-DNA mit 50µl Bakterien in einem Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Ø0,1cm) überführt und für 1-3min auf Eis inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte dann mit 1,75kV, 400Ω und 25mF (Gene Pulser, BIORAD, München). Die Bakterien wurden sofort in 500µl LB-Medium aufgenommen, für 60min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und auf einer LB-Agarplatte mit Chloramphenicol ausplattiert.

3.5.10 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

3.5.10.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol ausgefällt werden (Eickbush & Moudrianakis, 1978). Als Fällungsreagenzien wurden dabei $\frac{1}{10}$ Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 und die 2,5fache Menge 100% (v/v) Ethanol verwendet. Die Volumenangaben beziehen sich auf das Volumen der zu fällenden Nukleinsäurelösung. Die Fällung erfolgte bei -20°C üN oder bei -80°C für 30-60min. Je niedriger die Temperatur ist, desto schneller fallen die Nukleinsäuren aus, allerdings besteht dabei die Gefahr, dass Salze mit ausfallen. Eine zu kurze Präzipitationsdauer ist vor allem bei geringen DNA-Mengen kritisch.

Nach dem Fällern wurde die Probe für 20min bei 4°C mit $20.000\times g$ (Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) pelletiert und das entstandene Präzipitat mit $200\mu\text{l}$ 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um eventuell vorhandenes Salz zu entfernen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für 15min bei $20-22^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Das Rücklösen der Pellets erfolgte in einem geeigneten Volumen TE oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$.

Natriumacetat:

3M	NaAc \times 3H ₂ O
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen und autoklavieren.

TE Puffer:

10mM	Tris
1mM	EDTA \times 2H ₂ O
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

Tris Puffer:

10mM	Tris
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

3.5.10.2 DNA Isolierung aus Virusüberständen

Um virale DNA aus Zellkulturüberständen oder Viruspräparationen zu gewinnen, wurde der *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Mannheim) verwendet.

In einem ersten Schritt erfolgt die Virus-Lyse in Gegenwart von Proteinase K und anschließend die reversible Bindung der DNA an eine Glasfaser-Membran in Gegenwart von schützender Poly(A)⁺ *Carrier*-RNA. Nach Reinigung der Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen Kontaminanten durch Waschen der Membran kann die DNA von der Membran eluiert werden.

Die so isolierte DNA diente zur Überprüfung der Exzision von BAC-Sequenzen nach *in vitro*-Passagierung der mittels BAC-Technologie hergestellten rekombinanten Viren (siehe 3.2.4) und zur Bestimmung ihres Genom/pfu-Verhältnisses (siehe 4.5.4), sowie als *Template* für Sequenzierungen.

Herstellerprotokoll unter:

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter2/page_69-73.pdf

3.5.10.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Diese Methode diente der schnellen Überprüfung von transformierten Bakterienkolonien auf Anwesenheit des gewünschten Klonierungskonstruktes. Dazu wurden 5ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des ausplattierten Transformationsansatzes angeimpft und üN bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert.

Von Bakteriensuspension wurden 1,5-2ml in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 14.000rpm (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) für 60s pelletiert. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte in 100µl eiskaltem Puffer I. Zur alkalischen Lyse wurden 200µl Lösung II zugegeben, der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt, und anschließend für 5min bei 20-22°C inkubiert. Nach Zugabe von 150µl eiskalter Lösung III und anschließender Inkubation für 10min auf Eis konnten SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile ausgefällt werden. Die gefällten Bestandteile wurden im Folgenden bei 14.000rpm für 10min pelletiert, die DNA aus dem Überstand mit 400µl Isopropanol gefällt und bei 14.000rpm für 20min bei 4°C präzipitiert. Nach dem Waschen mit 250µl 70%igem (v/v) Ethanol wurde die DNA kurz getrocknet und in 20-50µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 oder H₂O gelöst. Die DNA kann im Anschluss bei -20°C gelagert werden.

Puffer I:

50mM	Tris
10mM	Na ₂ EDTA×2H ₂ O
	ad H ₂ O _{demin.}

Mit HCl auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren und danach 100mg/l RNase dazugeben.

Lösung bei 4°C lagern.

Puffer II:

200mM	NaOH
1% (v/v)	SDS
	ad H ₂ O _{demin.}

Lösung autoklavieren und bei RT lagern.

Puffer III:

3M	KAc
	ad H ₂ O _{demin.}

Mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

3.5.10.4 Schnellpräparation von BAC-Plasmiden

Vom Prinzip wird auch für die Präparation von BAC-Plasmiden die in 3.5.10.3 beschriebene Methode verwendet. Dabei müssen allerdings einige Modifikationen beachtet werden, da es sich bei den BAC-Plasmiden um besonders große *low-copy* Plasmide handelt. So besitzt die mCMV-BAC-DNA eine Größe von ca. 240kbp. Deshalb gilt es zur Erhaltung ihrer Integrität Scherkräfte zu vermeiden. Dies bedeutet u. a. ein Verzicht auf Vortexen und die Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen.

In 15ml Falcon-Reaktionsgefäßen wurden 10ml LB-Medium mit Chloramphenicol mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16-18h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Anlage einer Glycerol-Kultur (siehe 3.5.8.3) wurde die Übernachtskultur durch Zentrifugation mit 4.500rpm (Heraeus Labofuge 400R, Rotor 8172) bei 4°C für 5min pelletiert. Das Pellet wurde in eiskaltem 250µl Puffer I resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden 350µl Puffer II zugegeben, der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt und anschließend für 5min bei 20-22°C inkubiert. Nach Zugabe von 350µl eiskaltem Puffer III und Inkubation für 10min auf Eis fielen SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile aus. Nach Zentrifugation mit 14.000rpm (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) bei 4°C für 10min wurde der Überstand mit 700µl raumtemperiertem Isopropanol versetzt, suspendiert und erneut für 25min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene DNA-Präzipitat wurde mit 1ml 70%igem (v/v) Ethanol ge-

waschen, luftgetrocknet, in 100µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und zum besseren Lösen der DNA für 10min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

Puffer:

siehe unter 3.5.10.3

3.5.10.5 QIAprep Spin Miniprep

Das Prinzip der QIAspin Miniprep beruht auf der Kombination einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen und anschließender reversibler Adsorption der DNA an eine Silica-Gel-Membran. Durch die Veränderungen der Salzkonzentrationen während der einzelnen Arbeitsschritte erfolgt die Trennung der Plasmid-DNA von der genomischen DNA, Proteinen und Bakterien-Bruchstücken sowie die Elution der Plasmid-DNA.

Diese Methode wurde dann herangezogen, wenn reine Plasmid-DNA, wie z. B. für Sequenzierung oder Transformation, benötigt wurde. Die QIAprep Spin Minipreps wurden nach Angaben des Herstellers (QIAprep Miniprep *Handbook*) mit 1,5ml Bakteriensuspension von einer 5ml Übernachtskultur durchgeführt. Die DNA konnte mit 50µl Elutions-Puffer (10mM Tris/HCl, pH 8,5) von den Spin-Säulen eluiert werden.

Herstellerprotokoll unter: http://www1.qiagen.com/HB/QIAprepMiniprepKit_EN

3.5.10.6 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation

Um größere Plasmidmengen aufzureinigen, wurde eine Plasmidpräparation mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Protokoll dieser Plasmid-Aufreinigung beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer Bindung der Plasmid-DNA unter geeigneten Niedrigsalz- und pH -Bedingungen an eine Anionenaustauscher-Säule. Zelluläre Bestandteile wie RNA, Proteine und sonstige niedermolekulare Verunreinigungen werden bei mittlerer Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die gereinigte Plasmid-DNA kann mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert werden und wird zur Entsalzung mit Isopropanol gefällt.

Von einer 5ml Vorkultur ausgehend wurde die eigentliche Übernachtskultur in 150ml für *high-copy* Plasmide bzw. 500ml für *low-copy* Plasmide 1:1000 in selektivem LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei entsprechender Temperatur für 12-16h inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA in einem geeigneten Volumen TE Puffer pH 8,0 oder Tris pH 8,5 aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

Herstellerprotokoll unter: http://www1.qiagen.com/HB/QIAGENPlasmidPurification_EN

3.5.10.7 BAC-Plasmid Maxipräparation

Die Aufreinigung größerer Mengen hochreiner BAC-DNA erfolgte unter Verwendung des *Nucleobond* Kit PC 500 (Macherey & Nagel, Düren). Dazu wurden 500ml LB-Medium 1:500 mit einer frischen Bakterien-Vorkultur angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 5000×g (Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA-1500) bei 4°C für 10min pelletiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll, wobei das Lysat über einen Faltenfilter geklärt wurde. Nach dem letzten Schritt erfolgte die Aufnahme der BAC-DNA in 200-250µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 und ihre Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

Herstellerprotokoll unter:

[https://www.macherey-nagel.com/web%5CMN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PLASMID11/\\$File/PlasmidDNA_NuBo_R04.pdf](https://www.macherey-nagel.com/web%5CMN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PLASMID11/$File/PlasmidDNA_NuBo_R04.pdf)

3.5.11 Polymerase Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Mullis und Falloona entwickelt und von Saiki et al. (1989) optimiert. Mittels PCR können selektiv bestimmte Sequenzabschnitte einer DNA amplifiziert werden. Die Enden der zu amplifizierenden Sequenz werden über sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) definiert. Die Amplifikation wird von den *Primern* ausgehend durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase z. B. *Taq*-Polymerase katalysiert. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei etwa 94-95°C. Durch Reduzierung der Temperatur, abhängig von der *Primer*-Sequenz, kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge (*Annealing*). Anschließend erfolgt bei 72°C die Neusynthese der DNA-Doppelstränge durch die DNA-Polymerase (*Extension*). Durch Wiederholung der Schritte erfolgt eine exponentielle Synthese der spezifischen DNA-Abschnitte. Theoretisch entstehen bei n Amplifikationsrunden 2^n Amplifikate.

Bei der Auswahl der *Primer*-Sequenzen ist auf ausreichende Sequenzspezifität (Länge von 16-20 Nukleotiden) und auf bestmögliche Hybridisierung am 3'-Ende durch ein Guanin oder Cytosin zu achten.

Standard *Taq* oder HotStar *Taq* PCR Ansatz

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10×PCR Puffer	5µl	1×
dNTP Mix (10mM jedes)	1µl	400µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
Primer-rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
<i>Taq</i> /HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	0,25µl	1,25U
H ₂ O _{reinst.}	variabel	
Template DNA	Variabel, max. 5µl	100-1000ng genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
	Endvolumen 50µl	

Standard HotStar *Taq* Profil

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Bemerkung</u>
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase
<i>3-Schritt Cycling</i>			
Denaturierung	30-60s	94°C	
<i>Annealing</i>	30-60s	50-68°C	in Abhängigkeit von der <i>Primer</i> Sequenz
<i>Extension</i>	60s/1kbp	72°C	Zyklenzahl 30-35
Abschließende <i>Extension</i>	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

Für PCRs mit normaler *Taq*-Polymerase wurde statt des initialen Aktivierungsschrittes ein initialer Denaturierungsschritt von 3min durchgeführt.

3.5.11.1 PCR für Klonierungszwecke

Mit Hilfe der PCR ist es möglich bestimmte DNA Sequenzen beispielsweise Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen durch Integration in den *Primer* in das zu generierende PCR-Produkt einzubringen. Das PCR-Produkt kann nachfolgend in einen Vektor ligiert werden (siehe 3.5.7). Bei der Auswahl der *Primer* ist darauf zu achten, dass die Restriktionsschnittstellen nicht am direkten 5'-Ende liegen, sondern *upstream* ein Überhang von 3-4 „nonsense“ Basen vorhanden ist. Dies ist nötig, damit auch am Ende eines DNA-Stranges die Restriktionsenzyme effektiv schneiden können (Zimmermann et al., 1998).

Um eine möglichst geringe Fehlerrate während der PCR zu erhalten, wurde die *ProofStart* DNA-Polymerase der Firma QIAGEN verwendet. Hierbei handelt es sich um eine rekombinante DNA-Polymerase, die auf einer aus *Pyrococcus spec.* isolierten Polymerase basiert. Sie besitzt eine 3'→5'-, aber keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität und ist somit in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide vom 3'-Ende des wachsenden DNA-Stranges zu korrigieren. Für größere PCR-Produkte (>2kbp) wurde eine Kombination aus *ProofStart* DNA-Polymerase und Hotstar *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet.

Herstellerprotokoll unter: http://www1.qiagen.com/HB/ProofStartDNAPolymerase_EN

Standard *ProofStart* PCR Ansatz

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10× <i>ProofStart</i> Puffer	5µl	1×
dNTP Mix (10mM jedes)	1,5µl	300µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
Primer-rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
<i>ProofStart</i> DNA Polymerase	1µl	2,5U
H ₂ O _{reinst.}	variabel	
<i>Template</i> DNA	variabel max. 5µl	100-1000ng genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
	Endvolumen 50µl	

Standard *ProofStart* Profil

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Bemerkung</u>
Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	Aktivierung der <i>ProofStart</i> -Polymerase
<i>3-Schritt Cycling</i>			
Denaturierung	30-60s	94°C	
<i>Annealing</i>	30-60s	50-68°C	In Abhängigkeit von der <i>Primer</i> Sequenz
<i>Extension</i>	60s/1kbp	72°C	Zyklenzahl 35-40
Abschließende <i>Extension</i>	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

3.5.11.2 Mutagenese durch Kombinations-PCR

Für die Mutagenese von Sequenzabschnitten wurde die von Ho et al. (1989) beschriebene Methode angewendet. Deren Prinzip beruht darauf, dass zunächst zwei separate PCRs parallel durchgeführt werden (PCR1 und PCR2, siehe Abb. 7). Die dabei verwendeten *Primer* Mut1 und Mut2 bestehen an ihrem 3'-Ende aus 15-20 Basen, die homolog zur Template-Sequenz sind und vor der auszutauschenden Sequenz enden, und tragen an ihrem 5'-Ende die einzubringende Sequenz. Je nach Struktur der verwendeten *Primer* Mut1 und Mut2 ist auch ein Sequenz *Knock-out* oder eine Punktmutation möglich.

Nach der Aufreinigung der Amplifikate mittels Gel-Elution (siehe 3.5.4) wurden jeweils 1/10 der gereinigten Amplifikate in die Kombinations-PCR mit den *Primern* Flank1 und Flank2 eingesetzt. Aus dieser PCR resultierte dann ein DNA-Fragment, das den gewünschten Sequenzaustausch enthielt. Das Endprodukt wurde mittels Gel-Elution aufgereinigt und mittels entsprechender Klonierungsschritte in einen Vektor eingebracht. Die Durchführung der Kombinations-PCR erfolgte nach dem in 3.5.11.2 beschriebenen Protokoll.

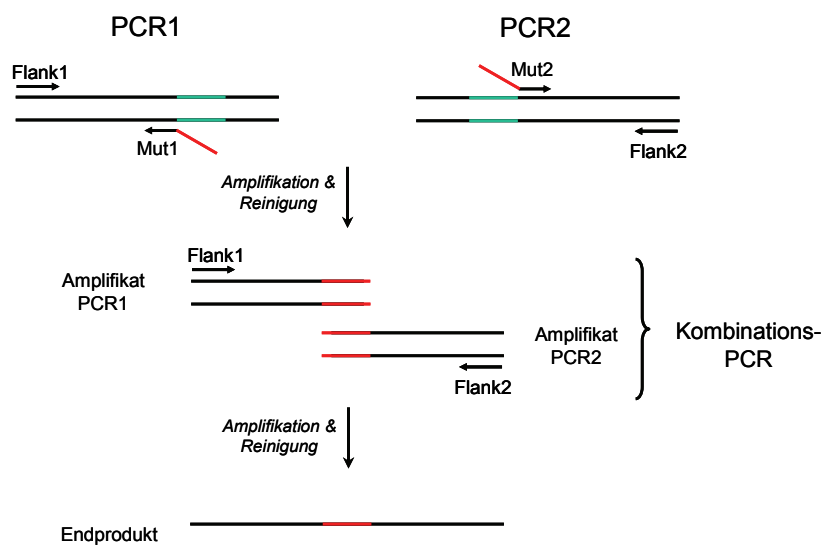


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Kombinations-PCR zur gerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen.

Flank1, Mut1, Mut2 und Flank2 stellen die Primer dar. Mut1 und Mut2 sind komplementär zueinander und unterscheiden sich im Bezug auf die Matrizen-Sequenz nur durch die einzuführende Mutation. In die Kombinations-PCR werden die Primer Flank1 und Flank2 eingesetzt sowie die gereinigten Amplifikate aus PCR1 und PCR2, wobei ein langes DNA-Fragment (Endprodukt) entsteht, das von den eingesetzten Primern begrenzt wird.

3.5.11.3 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Bei einer konventionellen PCR erfolgt die Detektion der Amplifikate am Ende der PCR im Agarosegel. Dies geschieht normalerweise zu einem Zeitpunkt, an dem aufgebrauchte Substrate und abnehmende Polymerase-Aktivität zu einem Plateau der Amplifikation führen. In dieser Phase kann man anhand der Bandenstärke keinerlei Aussagen über die Ausgangskonzentration der DNA-Matrize machen.

Im Gegensatz dazu kann in der *real-time* PCR die exponentielle Wachstumsphase der Reaktion verfolgt werden, die sich durch eine exakte Verdopplung (Reaktionseffizienz 100%) der Amplikons auszeichnet. Die Detektion erfolgt entweder nicht-sequenzspezifisch mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z. B. *SYBR Green*) oder sequenzspezifisch mit Fluorochrom-gekoppelten Sonden (z. B. *TaqMan* Sonden, *FRET* Sonden oder *Molecular Beacons*). Durch die Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden.

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide (siehe 2.8.1.2) erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer-Express* Version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.5.11.4 Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung

Durch Nutzung eines Plasmid-Standards mit definierter Teilchenanzahl lassen sich DNA-Proben mittels *real-time* PCR absolut quantifizieren. Die Plasmide wurden zuerst linearisiert (siehe 3.5.2), über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.5.4) und schließlich in *Aqua bidest.* oder Tris Puffer pH 8,0 titriert. Die Berechnung der Teilchenzahl erfolgte über folgende Formel:

$$\text{Teilchenmenge}[\text{Plasmide}/\mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] \times \text{Konzentration}[\text{g}/\mu\text{l}]}{\text{MW}[\text{g/mol}]}$$

MW für dsDNA: Plasmidgröße [bp] × 660 Dalton/bp

3.5.11.5 *TaqMan* qPCR

Für den Nachweis der BAC-Freiheit eines rekonstituierten Virus sowie zur Überprüfung des Genom/pfu-Verhältnisses wurde eine quantitative *real-time* PCR mit *TaqMan* Sonden (*dual labeled probes*) durchgeführt. Der Vorteil in der Verwendung von Sonden liegt in der sehr hohen Spezifität, da nur Amplifikate detektiert werden, an denen die Sonde gleichfalls bindet. Die Sonden tragen an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenz-Reporter und am 3'-Ende einen *Quencher*. Bindet die so markierte Sonde auf der ssDNA, wird die Sonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut (Holland et al., 1991). Dies führt zur räumlichen Trennung von Reporter und *Quencher* und somit zur Emission der Reporter-Fluoreszenz, die nun nicht mehr vom *Quencher* unterdrückt wird. Durch die hohe Spezifität der Sonde ist der zu detektierende Anstieg der Fluoreszenzintensität proportional zum gebildeten Produkt.

TaqMan Ansatz mit QuantiTect Probe PCR Kit für *TaqMan* 7500

<u>Komponente</u>	<u>Volumen/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
2×QuantiTect Probe PCR Master Mix	10µl	1×
Primer-for (10pmol/µl)	2µl	1µM
Primer-rev (10pmol/µl)	2µl	1µM
<i>Template</i> DNA	2-5µl	≤ 1µg
H ₂ O _{reinst.}	variabel	
	Endvolumen 20µl	

Die PCR mit *TaqMan* Sonden wurde als sogenannte *two-step* PCR durchgeführt, d.h. es gab einen gemeinsamen *Annealing/Extension* Schritt.

TaqMan Profil mit *TaqMan* Universal Master Mix für *TaqMan* 7500

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Bemerkung</u>
Initialer Aktivierungsschritt	10min	95°C	Aktivierung der Polymerase
2-Schritt <i>Cycling</i>			
Denaturierung	15s	94°C	
<i>Annealing/Extension</i>	60s	60°C	Daten Akquisition Zyklenzahl 50

3.5.12 Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Technologie

Die Generierung von mCMV-Rekombinanten mit Austausch eines D^d restringierten anti-genen Peptids im ORF *m164* gegen das K^b restringierte Peptid SIINFEKL erfolgte mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in *E.coli*. Der *knock-out* von Immunevasions-Genen wurde mit dem Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren durchgeführt.

Alle dazu benötigten Plasmide wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

3.5.12.1 Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren im *E.coli* Stamm DH10B

Die Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese in *E.coli* wurde in Anlehnung an die Verfahren von O'Connor et al., 1989; Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; 2004a; b: sowie Wagner et al., 1999, durchgeführt. Für eine schematische Darstellung siehe Abb. 8.

Alle mCMV-sequenzspezifischen Manipulationen (Mutationen etc.) wurden in *high-copy* Vektoren durchgeführt. In einem abschließenden Klonierungsschritt wurde dann das manipulierte DNA-Fragment in das *low-copy Shuttle*-Plasmid pST76K_SR (Pósfai et al., 1997; Hobom et al., 2000; Borst et al., 2004b) ligiert. Für eine effektive und spezifische homologe Rekombination ist es notwendig, dass die einzubringenden Sequenzen von gleich langen Sequenzen (1,5-3kbp zu jeder Seite, Smith, 1988a), die homolog zum Integrationsort sind, flankiert werden.

I. Cotransformation des *Shuttle*-Plasmids und Bildung der Cointegrate

Elektrokompetente DH10B Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 1ng *Shuttle*-Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.5.9.2) und für 1h in LB-Medium (ohne Antibiotika) bei 30°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde im Folgenden auf LB-Platten (Cam / Kan) ausgestrichen und für 24-36h bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Dabei erfolgt eine erste homologe Rekombination. Die so gebildeten Cointegrate haben die *Shuttle*-Plasmid-DNA vollständig in das mCMV-BAC-Plasmid integriert.

II. Anreicherung der Cointegrate und Entfernung der *Shuttle*-Plasmide

10 Bakterienkolonien des Schrittes I wurden mittels Verdünnungsausstrich auf LB-Platten (Cam/Kan) ausgestrichen und üN bei exakt 43°C im Brutschrank inkubiert. Bei 43°C können nur Cointegrate, nicht aber *Shuttle*-Plasmide replizieren, da bei dieser Temperatur ein falsch gefaltetes RepA-Protein entsteht, das den temperatursensitiven Replikationsursprung *pSC101* nicht mehr induzieren kann (Hashimoto-Gotoh et al., 1981; Steinmetz et al., 1985; Blomfield et al., 1991). In diesem Schritt ist das Entstehen von großen Einzel-Kolonien essentiell. Aus diesem Grund kann es notwendig sein, diesen Schritt zu wiederholen.

III. Cointegrat-Auflösung

Um den Cointegraten die Möglichkeit zur Auflösung, d. h. zur erneuten homologen Rekombination zu geben, wurden 10 Bakterienkolonien aus Schritt II auf LB-Platten (Cam) als Verdünnungsausstrich ausplattiert und ca. 30h bei 30°C inkubiert.

Dieser Schritt konnte optional wiederholt werden, um Kolonien zu vereinzeln und weiter die homologe Rekombination zu ermöglichen. Die resultierenden Klone sind eine Mischung aus Bakterien mit aufgelösten und Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten.

IV. Selektion gegen nicht-aufgelöste Cointegrate

Die Identifizierung von aufgelösten Cointegraten erfolgte über einen Verdünnungsausstrich von 10 Klonen aus Schritt III auf LB-Platten (Cam) mit 5% (w/v) Saccharose (Inkubation für 30h bei 30°C). Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt.

Unter diesen Bedingungen können nur Bakterien mit aufgelösten Cointegraten replizieren, da sie das *SacB*-Gen verloren haben. Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten exprimieren hingegen das Exoenzym Levan-Saccharase, welches die Synthese des Polysaccharids Levan aus Saccharose katalysiert (Blomfield et al., 1991). Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Levan im periplasmatischen Raum mit letalen Konsequenzen für *E.coli* (Gay et al., 1983).

V. Testen auf aufgelöste Cointegrate

Durch die Auflösung der Cointegrate haben die Bakterien die zuvor eingebrachte Kan-Resistenz wieder verloren. Die daraus folgende Kan-Sensitivität wurde bei 100 Einzelkolonien des Schrittes IV getestet. Dazu wurden LB-Platten (Kan / Cam) und LB-Platten (Cam) parallel beimpft und bei 37°C üN inkubiert. Dabei ist es wichtig, zuerst die Kan- und dann erst die Cam-Platte zu beimpfen. Mindestens 80% der Klone sollten Kan-sensitiv sein.

VI. Charakterisierung Kan-sensitiver Klone

Von 10 Kan-sensitiven Bakterienkolonien wurde je eine 10ml LB-Kultur (Cam) angeimpft und bei 37°C üN unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die BAC-DNA isoliert (siehe 3.5.10.7) und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Zur Sicherung der Klone wurden von diesen Glycerinkulturen angelegt.

Durch die Restriktion konnte die globale Integrität des mCMV-Genoms kontrolliert werden. Dieses kann in einigen Fällen größere Deletionen aufweisen, da es in Folge der *RecA*-Expression zu Instabilitäten durch unerwünschte intramolekulare Rekombinationsereignisse im mCMV-BAC-Genom kommen kann (Horsburgh et al., 1999; Smith & Enquist, 2000). Zur Identifikation der gesetzten Mutationen wurde mittels PCR der entsprechende Sequenzabschnitt vervielfacht und nach Reinigung über ein Agarosegel sequenziert. Statistisch gesehen sollten 50% der Klone dieser Kolonien das korrekt mutierte mCMV-BAC-Plasmid enthalten.

VII. Virusrekonstitution

Für die abschließende Virusrekonstitution wurde mCMV-BAC-DNA aufgereinigt (siehe 3.10.7) und die Rekombinanten in MEF nach dem in 3.1.4 beschriebenen Protokoll rekonstituiert.

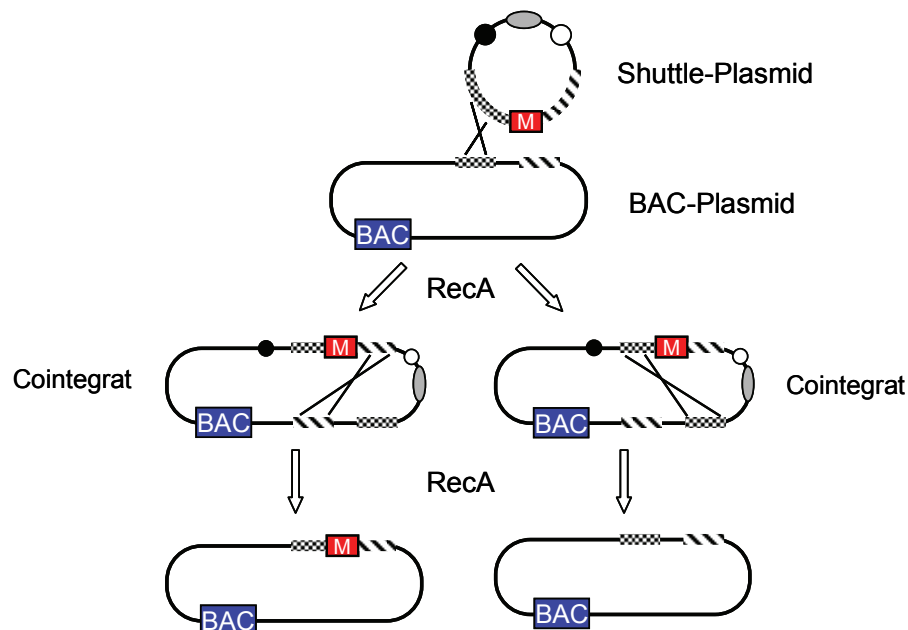


Abb. 8: Schema der Zwei-Schritt-mCMV-BAC-Mutagenese in *E. coli*

Eine Mutation (M, rot) flankiert von viralen Sequenzen (schraffiert und schräg-schraffiert), wurde in ein *Shuttle*-Plasmid kloniert. Das *Shuttle*-Plasmid kodiert für einen positiv (Kan-Resistenz; graue Ellipse) und einen negativ Selektionsmarker (*sacB*; schwarzer Kreis) sowie die Rekombinase *RecA* (weißer Kreis). Die Transformation des *Shuttle*-Plasmids in mCMV-BAC-Plasmid tragende *E. coli* führt zur homologen Rekombination und Bildung eines Cointegrates. In einem zweiten Rekombinationsschritt kommt es zur Auflösung des Cointegrates entweder in ein mutiertes (links) oder in ein Wildtyp (rechts) Genom (verändert nach Brune et al., 2006).

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Gewinnung von Zellen aus der Milz

Isolierte Milzzellen wurden zur Anlage und Restimulation mCMV-spezifischer polyklonaler CD8 T-Lymphozytenlinien (siehe 3.6.3) sowie für ihre funktionale Analyse im *ELISpot*-Assay (siehe 3.6.5) und im Zytolysetest (siehe 3.6.6) benötigt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde die Milz der Maus entnommen und in ein mit Medium gefülltes 4ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Organ mit dem Stempel einer 5ml Spritze über einem Metallsieb zerrieben, dieses mit Medium gespült und die Zellsuspension pelletiert (5min, 1.900rpm, Megafuge 2.0 Heraeus). Zur Erythrozytenlyse wurde der Überstand verworfen, das Pellet in *Red Blood Cell Lysing Buffer* (RBLB) (Sigma-Aldrich, Nr. R 7757) resuspendiert und für ca. 2min unter Schwenken bei 20-22°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zwei- bis dreimal mit Medium gewaschen bis der Überstand klar war. Dann wurde das Pellet in einem definierten Volumen Medium aufgenommen, über ein 100µm Gazesieb gegeben und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.1.2). Die erwartete Zellzahl in der Milz eines unbehandelten Tieres liegt bei etwa 1×10^8 Zellen/Milz.

Abhängig vom Verwendungszweck wurden die Milzzellen in Kultur genommen, durch Bestrahlung inaktiviert oder mittels MACS weiter aufgereinigt.

Medium:

RPMI + 5% (v/v) FCS

3.6.2 MACS Separation

Für die magnetische Zellseparation werden sogenannte *MicroBeads* verwendet. Diese bestehen aus monoklonale Antikörpern, an deren F_c -Teil (para)magnetische Partikel gebunden sind. Nach der Bindung der Antikörper an Epitop-tragende Zellen werden diese in einem Magnetfeld einer Separationseinheit zurückgehalten, während die nicht Antikörper-tragenden Zellen die Säule durchlaufen. Zur Elution wird die Säule außerhalb des Magnetfelds mit Druck gespült und die Zellen aufgefangen (Miltenyi et al., 1990).

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieser Methode CD8 T-Lymphozyten aus Milzzellen angereichert. Die Anreicherung erfolgte normalerweise mit dem autoMACS. Dieser erlaubt eine automatisierte Zellseparation durch die Übernahme aller säulenbezogener Schritte wie Äquilibration, Probenaufnahme und Elution positiver und negativer Fraktionen.

3.6.2.1 Anreicherung von CD8 T-Lymphozyten mit Hilfe des autoMACS

Eine dem Protokoll angepasste Menge aufgearbeiteter Milzzellen (siehe 3.6.1) wurde nach dem Zählen in MACS-Puffer aufgenommen und mit CD8a (Ly-2) *MicroBeads* (Miltenyi Biotech, Nr. 130-049-401) versetzt. Standardmäßig wurden je 1×10^7 Zellen, 90 μ l MACS-Puffer und 10 μ l *MicroBeads* eingesetzt. Bei größeren Zellmengen mussten *Bead*- und Puffermengen entsprechend angepasst werden. Dabei durfte die Bindekapazität der autoMACS Säule von 2×10^8 markierten Zellen in 4×10^9 Gesamtzellen nicht überschritten werden. Die Zellen wurden mit den *MicroBeads* für 15min bei 4°C inkubiert und zur Entfernung von nicht gebundenen *Beads* mit MACS-Puffer gewaschen (10min, 1700rpm, Eppendorf 5414C). Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 500 μ l MACS Puffer pro 1×10^8 Zellen und die anschließende Separierung über das Programm „posseld“ (positive Selektion über zwei Säulen) des autoMACS, um eine größtmögliche Reinheit der Aufreinigung zu erreichen.

Nach Ende der automatisierten Aufreinigung wurde das Eluat mit Medium gewaschen (5min, 2500rpm, Eppendorf 5414C), das Pellet in einem geringen Volumen Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in einem versuchsbedingten Volumen MEM-ALPHA resuspendiert. Die zu erwartende Frequenz von CD8 T-Zellen beträgt in der Milz etwa 2% der Gesamtzellzahl.

MACS-Puffer (5×):

2,5% (w/v)	BSA
10mM	EDTA
	ad PBS

Lösung sterilfiltrieren, bei 4°C lagern und vor Gebrauch mit sterilem PBS 1:5 verdünnen.

Medium:

MEM-ALPHA + 10% (v/v) FCS

3.6.3 Anlage und Restimulation von zytolytischen T-Zellen

Aus *ex vivo* isolierten Milzzellen von akut oder latent mit mCMV-infizierten Mäusen können spezifische zytolytische T-Zellen expandiert werden. Dazu werden die T-Zellen in IL-2 haltigem Medium kultiviert und in gewissen Abständen mit antigenem Peptid restimuliert. Die *Memory*-T-Zellen reifen während der Kultivierung zu Effektor-T-Zellen, die typische Effektorfunktionen wie IFN γ -Sekretion und zytolytische Aktivität zeigen. Ihre Spezifität ist abhängig von dem bei der Restimulation verwendeten Antigen.

Die Anlage erfolgte aus isolierten, angereicherten CD8 T-Zellen (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Von diesen wurden $1,5 \times 10^7$ Milzzellen pro *Well* in 1,5ml MEM-ALPHA ohne IL-2 in einer beschichteten 24-*Well* Platte ausgesät. Dem Medium wurde direkt die benötigte Peptid-Konzentration (10^{-8} - 10^{-11} M) zugesetzt. Nach 4 Tagen Inkubation erfolgte die Supplementierung mit 0,5ml IL-2 haltigem Medium je *Well* (entspricht 50U IL-2 pro Kultur) und eine Woche nach Anlage die erste Restimulation. Die ersten beiden Restimulationen wurden wöchentlich, alle späteren im Zwei-Wochen Rhythmus durchgeführt. Die T-Zellen wurden vor der Restimulation dichteabhängig im Verhältnis 1:2 geteilt oder es wurde soviel Medium abgenommen, dass 1ml Restimulations-Medium hinzugegeben werden konnte. Es ist wichtig, die Zellen vor der ersten Restimulation in eine neue Platte zu überführen, weil dabei am Boden haftende Fibroblasten verlorengehen.

Für die Restimulation wurden Milzen nach 3.6.1 aufgearbeitet und nach der Bestimmung der Zellzahl letal bestrahlt (30Gy; [^{137}Cs]-Quelle). Anschließend wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen mit einer entsprechenden Peptidmenge in 1ml IL-2 haltigem Medium versetzt und zu den T-Zell Kulturen gegeben.

Restimulationsmedium:

MEM-ALPHA + 10% (v/v) FCS + 100U rhIL-2/ml

3.6.4 Zielzellen für mCMV-spezifische Effektor-CTL

Als Zielzellen zur Untersuchung der Spezifität und zytolytischen Effizienz von CD8 T-Zellen wurden Antigen-präsentierende Zielzellen eingesetzt. Diese wurden zur Präsentation endogen prozessierter Antigene mit mCMV infiziert oder exogen mit Antigen beladen.

3.6.4.1 mCMV-infizierte Zielzellen

Die Herstellung von mCMV-infizierten Zielzellen erfolgte durch zentrifugale Infektion von MEF (siehe 3.2.3). Bei Bedarf lassen sich durch den Einsatz von Inhibitoren der Transkription und der Proteinbiosynthese infizierte Zellen in den unterschiedlichen Phasen des viralen Replikationszyklus arretieren (Honess & Roizman, 1974; Reddehase et al., 1986). Vor der Verwendung der Zellen wurden die Zellen geerntet, gewaschen und im jeweiligen Assay eingesetzt.

Late(L)-Phase-Zielzellen:

Die zentrifugale Infektion der Zellen mit einer MOI von 4 erfolgte etwa 18h vor Verwendung. In dieser Zeit erreichen die Zellen die Late(L)-Phase des Replikationszyklus.

Early(E)-Phase-Zielzellen:

Die zentrifugale Infektion der Zellen mit einer MOI von 4 erfolgte 16h vor Testung mit gleichzeitiger Zugabe von 5µl/ml PAA. Dieses ist ein Inhibitor der viralen DNA-Polymerase und bewirkt ein Arretieren des Replikationszyklus in der *Early*-Phase.

3.6.4.2 Exogen beladene Zielzellen

Neben Zellen, die nach mCMV-Infektion endogen prozessierte Peptide auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, kamen auch exogen mit antigenem Peptid beladene Zellen als Zielzellen zum Einsatz (Townsend et al., 1986). Dazu wurden trypsinierte MEF in Medium mit einer geeigneten Konzentration synthetischen Peptids für 30-60min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1ml Medium gewaschen (2min, 2600rpm, Eppendorf 5414). Danach konnte die Zahl der Zellen bestimmt (siehe 3.1.2) und die Zielzellen im entsprechenden Assay eingesetzt werden.

3.6.5 *ELISpot (Enzyme linked immuno spot)-Assay*

Der *Enzyme linked immuno spot-Assay (ELISpot-Assay)* (Tarkowski et al., 1984; Czerkinsky et al., 1988) ist eine abgewandelte ELISA-(*enzyme linked immunosorbent Assay*)-Technik, bei der Einzelzellen, die ein Antigen sezernieren, nachgewiesen werden können. Dieses steht im Gegensatz zur Anwendung der ELISA-Technik, die zur Bestimmung der Menge eines sezernierten Antigens, meist ein Zytokin, verwendet wird. Der *ELISpot-Assay* hat gegenüber anderen Detektionsmethoden, wie dem Zytolysetest (siehe 3.6.6) eine besonders hohe Sensitivität, da praktisch jede Antigen-sezernierende Zelle erfasst werden kann.

Das Prinzip der Detektion des sezernierten Antigens beruht auf einem klassischen Sandwich-ELISA. Die von den Zellen während einer Inkubationsphase sezernierten Antigene werden in einem ersten Schritt direkt von einem Fängerantikörper gebunden. Dieser ist an den aus einer Nylonmembran bestehenden Boden einer *ELISpot*-Mikrotiter Platte gebunden. Das Antigen wird in einem zweiten Schritt von einem enzymgekoppelten, gleichfalls Antigen-bindenden, Detektionsantikörper erkannt. Diese Bindung kann in einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen werden. Dabei bildet jede Antigen-sezernierende Zelle einen Spot, dessen Größe mit der Menge an Antigen korreliert und damit auch eine Abschätzung der Antigenmenge erlaubt (Czerkinsky et al., 1988; Miyahira et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde der *ELISpot*-Assay zur Detektion IFN γ sezernierender CD8 T-Zellen verwendet. Dazu wurde die Membran einer 96-Well-Nylonmembran-Platte mit 55 μ l/Well einer Fängerantikörper-Verdünnung μ N bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in frisch angesetzttem *Coating*-Puffer auf eine Endkonzentration von 5 μ g/ml. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal jeweils im Abstand von 15min mit H₂O_{reinst.} gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Membran-Bindungsstellen mit 200 μ l Medium pro Well für mindestens 1h bei 37°C. Währenddessen wurden die APC geerntet, gewaschen (5min, 1400rpm, Heraeus Megafuge 2.0), gezählt und auf eine Zellzahl von 1×10^5 /50 μ l pro Well eingestellt. Als APC wurden infizierte MEF (siehe 3.6.4.1) oder Peptid-beladene MEF (siehe 3.6.4.2) eingesetzt. Letztere wurden in einer versuchsabhängigen Peptid-Konzentration für 2h bei 37°C inkubiert. Die als Effektorzellen dienenden CD8 T-Zellen, frisch isoliert (siehe 3.6.1) oder kultiviert (siehe 3.6.3), wurden aufgearbeitet, gewaschen und titriert.

Nach der Blockierung wurde das Medium entfernt und 50 μ l/Well frisches Medium vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 50 μ l der APC und 50 μ l der Effektoren als Triplikate hinzupipettiert und μ N (14-18h) bei 37°C im Brutschrank co-kultiviert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch zehnmaliges Waschen mit 200 μ l/Well Waschpuffer entfernt und der Detektionsantikörper in *Dilution*-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 μ g/ml verdünnt. Von der Antikörperlösung wurden jeweils 50 μ l/Well auspipettiert und der Ansatz für 2h bei 20-22°C inkubiert. Ungebundener Detektionsantikörper wurde durch 5maliges Waschen mit 200 μ l/Well Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden 60 μ l des *Horseradish peroxidase* (HRPO)-Streptavidin-Konjugates, 1:250 in Waschpuffer + 5% FCS (v/v) verdünnt, auf jedes Well pipettiert, wieder für 2h bei 20-22°C inkubiert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen.

Durch Zugabe des HRPO-Substrats AEC kann die IFN γ Sekretion visualisiert werden. Dazu wurden 20mg (1 Tablette) AEC in 2,5ml Dimethylformamid gelöst, mit 47,5ml Na-Acetat-Puffer gemischt, mit 25 μ l 30%igem H₂O₂ versetzt und filtriert (0,8 μ m). Von dieser Lösung wurden 70 μ l/Well eingesetzt und die Farbreaktion nach etwa 10min durch dreimaliges Waschen mit H₂O_{reinst.} gestoppt. Nach dem Abziehen der Membran von der Platte und ihrem Trocknen an der Luft konnte die Auswertung bei 10-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Stereomikroskops erfolgen.

Puffer für Fängerantikörper (Coating-Puffer):

Stammlösung A: 150mM Na₂CO₃ ad H₂O_{demin.}

Stammlösung B: 150mM Na₂CO₃×H₂O ad H₂O_{demin.}

Jeweils 1ml A + 1ml B ad 10ml ad H₂O_{demin.} mit Stammlösung B auf pH 9,6 einstellen.

Puffer für Detektionsantikörper (Dilution-Puffer):

PBS + 1% (v/v) einer 23,3%igen BSA-Lösung

Ansatz für eine *ELISpot*-Platte: 5,5ml PBS + 60µl BSA-Lösung

Die beiden Antikörper-Puffer am Versuchstag frisch ansetzen.

Wasch-Puffer:

0,25% (v/v) Tween20
ad PBS

Na-Acetat-Puffer pH 5.0:

34mM NaAc×3H₂O
16mM Essigsäure
ad H₂O_{demin.}

HRPO (Horseradish peroxidase)-Streptavidin-Konjugat:

1mg/ml HRPO
ad H₂O_{demin.}

mindestens 1h vor Gebrauch ansetzen, Lagerung bei 4°C.

Konjugat-Verdünnungs-Puffer:

FCS 5% (v/v) ad Wasch-Puffer

3.6.5.1 Frequenzauswertung des *ELISpot*-Assay

Die Frequenzauswertung der IFN γ sezernierenden Zellen erfolgte mittels Regressionsanalyse. Dabei wird die Zahl der Effektorzellen auf der X-Achse und zugehörige Spotfrequenz auf der Y-Achse abgetragen. Die zugehörige Regressionsgerade kann über eine einfache Geradengleichung $y=ax$ beschrieben werden. Mit Hilfe dieser Gleichung kann dann die *most probable number* (MPN) der Spotfrequenz bestimmt werden.

Ermittlung der Geradengleichung erfolgte mit Hilfe der Software Mathematica 6, „*Linear-Regression*“ (Wolfram Research Inc., Champaign, IL). Des Weiteren wurde noch das 95% Konfidenzintervall und der zugehörige p-Wert errechnet.

3.6.6 Zytolysetest ($[^{51}\text{Cr}]$ -Release-Assay)

Die klassische Methode, die zellvermittelte Zytotoxizität von CD8 T-Zellen zu quantifizieren ist der Zytolysetest oder $[^{51}\text{Cr}]$ -Release-Assay (Brunner et al., 1968; Dunkley et al., 1974; Miller & Dunkley, 1974). Der Assay basiert auf der Messung von freigesetztem radioaktivem Chrom ($[^{51}\text{Cr}]$) aus lysierten Zellen. Dazu werden Zielzellen durch Inkubation in $[^{51}\text{Cr}]$ -haltigem Kulturmedium mit dem Chrom-Isotop beladen. Nach dem Entfernen von nicht aufgenommenem Chrom werden die Zielzellen mit den CD8 Effektorzellen zusammen für eine bestimmte Zeit co-kultiviert. Währenddessen erkennen und lysieren die Effektorzellen ihre Zielzellen und die freigesetzte Menge an Radioaktivität kann im Anschluss mit einem γ -Counter quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde der Zytolysetest zur Charakterisierung der lytischen Aktivität von kultivierten CD8 T-Zellen verwendet. Als Zielzellen kamen dabei Peptid-beladene EL-4 Zellen oder infizierte MEF zum Einsatz. Durch Titration von exogen beladenem Peptid bei gleichzeitig festem Effektoren/Target Verhältnis (15:1) kann die Sensitivität der Effektoren bestimmt werden. Zur Überprüfung der Erkennung der Zielzellen wurde hingegen das Effektor/Target Verhältnis titriert.

In der Durchführung wurden zunächst die Zielzellen mit $[^{51}\text{Cr}]$ beladen. Dazu wurden die Zellen geerntet, mit Medium gewaschen (1400rpm, 4min, Heraeus Megafuge 2.0), die Zellzahl bestimmt und 1×10^6 Zellen für den Assay eingesetzt. Die anschließende Markierung erfolgte mit $100\mu\text{Ci}$ $[^{51}\text{Cr}]$ für 75min bei 37°C . Zur Entfernung überschüssigen Chroms wurden die Zellen dreimal gewaschen und auf eine Zelldichte von 1×10^3 Zellen/50 μl eingestellt. Falls die Zielzelle exogen mit antigenem Peptid beladen wurde, erfolgte dies direkt in einer 96-Well-Platte. Dazu wurden 100 μl /Well einer Peptidtitration als Triplikate mit 1×10^3 Zellen ca. 30min bei 37°C inkubiert. Infizierte Zellen konnten direkt in den Assay eingesetzt werden.

Währenddessen wurden die Effektoren geerntet, gewaschen und ihre Zellzahl bestimmt. Die Effektoren wurden dann entweder in einer konstanten Konzentration ($1,5 \times 10^4$ Zellen/50 μl) oder als Titration (je 50 μl) in den 96 Well-Microtiter-Platten ausgesät.

Als Kontrollen wurden stets *high* (hc) und *low control* (lc) sowie die antigenunabhängige Zelllyse gemessen. In der hc wird die Gesamtaktivität von 1×10^3 Zielzellen bestimmt. In der lc erfolgt die Messung der durch Spontanlyse freigesetzten Radioaktivität in zellfreiem Überstand. Zur Bestimmung der antigenunabhängigen Zelllyse werden Effektoren mit unbeladenen Targets inkubiert und ebenfalls die freigesetzte Radioaktivität bestimmt.

Nach der Zusammenstellung der Ansätze wurde die Mikrotiter-Platte mit 110×g anzentrifugiert und 3,5h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben, bis auf die der hc, bei 500×g pelletiert und je 100µl Überstand in Counter-Röhrchen überführt.

Nach der Messung im γ-Counter erfolgte die Berechnung der spezifischen Lyse nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{cpm} - \text{lc})}{(\text{hc} - \text{lc})} \times 100 = \text{Prozent (spez. Lyse)}$$

cpm = *counts per min* der gemessenen Probe

hc = *high control*

lc = *low control*

Medium:

RPMI

3.6.7 Zytofluorometrische Analysen

Die zytofluorometrische Detektion von Zelloberflächenmolekülen erfolgte in einem FACSsort (*fluorescence activated cell sorter*; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg), der mit einem zweiten Laser ausgerüstet ist und somit wie ein FACSCalibur zur 4-Farben-Analyse verwendet werden kann.

3.6.7.1 Funktionsprinzipien des Zytofluorometers und Datenakquisition

Die Zytofluorometrie erlaubt neben einer Zählung auch die Analyse von Einzelzellen hinsichtlich ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften. Die wichtigste Anwendung ist die Charakterisierung von Expressionsmustern extra- oder intrazellulärer Antigene mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Die Antikörper können sowohl einzeln als auch kombiniert eingesetzt werden und erweitern dadurch die Analysemöglichkeiten.

Ein Zytofluorometer besteht vereinfachend beschrieben aus drei Bereichen: Dem System des Zelltransports, dem Laser und dem optischen System. Im Zelltransportsystem werden die Zellen in einer partikelfreien Flüssigkeit transportiert, vereinzelt und für die Messung in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch das Laserlicht geführt. Dieses wird mit einer Wellenlänge von 488nm von einem Argonlaser emittiert und nach Durchdringen des Zellstroms über das optische System zur Analyse geleitet. Das Streulicht wird dabei über eine Sammellinse gebündelt, über dichroitische Filter und Spiegel nach Wellenlänge getrennt und von Photodetektoren registriert.

Die grundlegende Charakterisierung der Zellen nach ihrer Zellgröße erfolgt über das Vorwärtstreulicht FSC (*Forward Scatter*), wobei das in einem Winkel von 2°-10° ge-

beugte Licht detektiert wird. Die Granularität der Zellen hingegen wird vom gebrochenen Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) in einem 90° Winkel bestimmt.

Die an Antikörper gekoppelten Fluorochrome werden durch den Laser kurzzeitig in einen angeregten Zustand überführt und geben beim Übergang in den Grundzustand Energie als Photon mit diskreter Wellenlänge ab. Dieses kann über hochempfindliche Photozellen (Photomultiplier) detektiert werden. Da sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen ist es notwendig dieses zu kompensieren, d.h. den jeweils überlappenden Anteil der Fluorochrome voneinander zu subtrahieren. Dies hat für jedes verwendete Fluorochrompaar einzeln zu erfolgen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper waren entweder FITC/Alexa Fluor®488 (Messung im FL-1 Kanal), PE/Alexa Fluor®546 (Messung im FL-2 Kanal), oder APC (Messung im FL-4 Kanal) konjugiert.

Tote Zellen lassen sich anhand ihres spezifischen Musters (geringer FSC und geringer SSC) von lebenden Zellen unterscheiden. Zur näheren Analyse lassen sich Zellpopulationen durch *Gates* in der Auswertesoftware (Cellquest Pro (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)) definieren und untersuchen.

3.6.7.2 Zellmarkierungen

Zelluläre Antigene können auf verschiedene Arten markiert werden. Dabei wird vorrangig zwischen Zelloberflächenmarkierung und Intrazellulärmarkierung unterschieden. Beide Markierungen können dann, je nach zu Verfügung stehenden Antikörpern, als direkte oder indirekte Markierung ausgeführt werden, d.h. der Antikörper liegt direkt Fluorochrom-gekoppelt vor oder es wird ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Je nach Anwendung können dabei die verschiedenen Methoden kombiniert werden.

Alle Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C im Dunkeln. Die verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangabe eingesetzt oder vor Benutzung in einem Vorversuch austitriert.

3.6.7.2.1 Oberflächenmarkierung

Für die Markierung von Oberflächenantigenen wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und zur Reduktion von unspezifischen Antikörperbindungen an zelluläre Fc-Rezeptoren mit einem CD16/CD32 FcγIII/II Rezeptorantikörper für 15min inkubiert. Danach konnte der Ansatz direkt mit dem entsprechenden Primärantikörper versetzt und für 30min inkubiert werden. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen (2min, 2600rpm, Eppendorf 5414) mit FACS-Puffer aus dem Ansatz entfernt. Bei Färbungen mit direkt gekoppelten Antikörpern konnte, nach Aufnahme der Zellen in 500µl FACS Puffer, nun die Messung am FACS erfolgen. Die Färbung eines ungekoppelten Primärantikörpers erfolgte analog mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper.

FACS-Puffer:

0,4% (w/v)	BSA
10mM	EDTA
0,003% (w/v)	NaN ₃
20mM	HEPES
	ad PBS

3.6.7.2.2 Intrazellulärmarkierung

Für die Intrazellulärmarkierung müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 100µl BD Zytofix/Zytoperm™ Lösung aus dem Zytofix/Zytoperm Kit (Nr. 554714, BD Bioscience Heidelberg) resuspendiert und für 30min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (2min, 2600rpm, Eppendorf 5414) mit BD Perm/Wash™-Puffer wurden die Zellen mit 100µl Primärantikörper-Lösung, verdünnt in Perm/Wash™-Puffer, versetzt, wieder für 30min inkubiert und ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Färbung des Primärantikörpers mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte analog.

FACS Puffer:

siehe 3.6.7.2.1

3.6.7.3 Quantifizierung von Oberflächenantigenen

Die absolute Quantifizierung von Oberflächenantigenen erfolgte mit Hilfe des QIFIKIT® (Dako, Hamburg, Nr. K0078) im Zytofluorometer. Dieser Kit beruht auf einem indirekten Immunfluoreszenz-Assay (Poncelet & Carayon, 1985). Dabei wird vom Hersteller eine Mischung aus fünf Populationen von Kalibrations-*Beads* mit einem Durchmesser von 10µm geliefert. Die *Beads* sind bereits mit einem mAb der Maus (anti-humanes CD5, Klon ST1, Isotyp IgG2a) beladen, deren genaue Zahl vom Hersteller ermittelt und angegeben wird. Des Weiteren werden noch sogenannte „*Set-Up*“-*Beads* mitgeliefert. Diese bestehen aus zwei Populationen unbeladener bzw. mit sehr hoher Antikörperzahl beladener *Beads*. Sowohl die Kalibrations-*Beads* als auch die „*Set-Up*“-*Beads* wurden in jeder Messung mitgeführt.

Die Vorbereitung der *Beads* erfolgte parallel zur Färbung der zu quantifizierenden Oberflächenantigene. Dazu wurden je 100µl „*Set-Up*“-*Beads* bzw. Kalibrations-*Beads* zweimal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (2min, 2600rpm, Eppendorf 5414) und mit 100µl des 1:100 verdünnten FITC-konjugierten F(ab)₂-Fragments für 30min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die *Beads* zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500µl FACS-Puffer resuspendiert und im Zytofluorometer gemessen.

Die Färbung der zu messenden Zellen erfolgte analog zu 3.6.7.2. Dabei ist allerdings zu beachten, dass als Sekundärantikörper das gleiche mitgelieferte FITC-konjugierte F(ab)₂-Fragment verwendet wird, wie zur Färbung der *Beads*. Daraus folgt, dass nur monoklonale Antikörper aus der Maus mit dieser Methode quantifiziert werden können. Die Messung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.7 Histologie

Um die Zahl der infizierten Zellen *in situ* nach Infektion mit rekombinanten Cytomegaloviren im Zeitverlauf vergleichen zu können, wurde die Leber histologisch untersucht.

3.7.1 Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen

3.7.1.1 Dehydratisierung und Paraffineinbettung der Gewebestücke

Für die histologische Färbung wurde die Einbettung in Paraffin gewählt, da diese eine sehr gute Strukturhaltung der Gewebe ermöglicht. Die entnommenen Organe wurden in 4% (v/v) gepuffertem Formalin für ca. 18h fixiert und anschließend für mind. 2h in Leitungswasser gewaschen. Die Gewebe müssen vor der Paraffineinbettung in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden. Der Wasserentzug erfolgt dabei in kleinen Schritten, um einer osmotisch bedingten Zellschädigung vorzubeugen. Nach vollständiger Dehydrierung wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Danach sind die Gewebestücke bei 20-22°C fast unbegrenzt lagerungsfähig.

Aufsteigende Alkoholreihe

20%	Isopropanol	1×	45min
40%	Isopropanol	1×	45min
60%	Isopropanol	1×	45min
80%	Isopropanol	1×	45min
100%	Isopropanol	3×	45min
100%	Xylol	3×	60min

Paraffineinbettung

1h	55°C
8-16h	55°C
4h	55°C
Einblocken bei 55-70°C	

Formalin (gepuffert):

67 mM	KH_2PO_4
84mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
140 ml	Formalin 37% (v/v)
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$

den pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen.

3.7.1.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Vor dem Schneiden der eingeblockten Organe wurden diese bei -20°C eingefroren und mit einer Schnittdicke von $2\mu\text{m}$ am Mikrotom geschnitten. Die erstellten Serienschnitte wurden im Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und dann im Warmwasserbad (40°C) gestreckt, um auf Objektträger aufgezogen werden zu können. Zur Glättung, Trocknung und Anheftung der Schnitte auf den Objektträgern erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C über Nacht.

3.7.1.3 Deparaffinierung und Rehydratisierung

Vor der weiteren Behandlung der Gewebeschnitte müssen diese von Paraffin befreit und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden.

Absteigende Alkoholreihe

100%	Xylol	3×	5min
90%	Isopropanol	1×	1min
70%	Isopropanol	1×	1min
50%	Isopropanol	1×	1min
	H ₂ O	1×	2min

3.7.2 mCMV-IE1-Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie (IHC) lassen sich spezifische Antigene in Organschnitten nachweisen. Dazu wird das Gewebe mit einem antigenspezifischen Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörperbindung kann dann mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung hochsensitiv nachgewiesen werden. Das Substrat der Färbung ist Diaminobenzidin (DAB), die Färbung kann durch den Zusatz von Nickelsulfat noch intensiviert werden (Bildung von schwarzen Präzipitaten).

Der Nachweis von mCMV-infizierten Zellen erfolgte in der IHC mit einem anti-mCMV-IE1 (pp89)-spezifischen Antikörper (Croma 101). Die rehydratisierten Gewebeschnitte wurden zur Permeabilisierung in Trypsin-Lösung inkubiert und danach in H₂O_{demin.} gewaschen.

Endogene Peroxidasen konnten mit Methanol-H₂O₂ inaktiviert und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch Präinkubation mit 1:10 verdünntem Kaninchenserum geblockt werden. Die Markierung der Schnitte mit dem IE1-spezifischen Antikörper Croma 101 (1:500 verdünnt in 1:10 verdünntem Kaninchenserum (in 1% (v/v) BSA-TBS)) erfolgte bei 37°C für 1h. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBS entfernt. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte mit einem biotinylierten polyklo-

nenalen Ziege-anti-Maus F(ab)₂-Fragment (siehe 2.1.6.1) (1:200 in 1% (v/v) BSA-TBS verdünnt) inkubiert (1h; 37°C).

Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC Kit PK-4000) wurde nach Anleitung des Herstellers angesetzt und die Gewebeschnitte für 30min mit ihm inkubiert. Die Färbung erfolgte im Anschluss über die in der zugegebenen Färbelösung ablaufende Substratreaktion.

Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte für drei Sekunden mit Hämalun (Hämalun nach Mayer) gegengefärbt. Dabei färben sich die Zellkerne nicht-infizierter Zellen blau. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in einer schnell aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert, und durch Einbetten in das synthetische Einschlussmittel Entellan dauerhaft konserviert. Ein genaues Protokoll liegt bei Podlech et al., 2002 vor.

Die Zahl IE1-positiver Zellen pro Fläche Gewebeschnitt (10mm²) wurde nach der Färbung im Durchlichtmikroskop bestimmt.

Schnell aufsteigende Alkoholreihe

50%	Isopropanol	1×	30s
70%	Isopropanol	1×	30s
90%	Isopropanol	1×	30s
100%	Isopropanol	2×	30s
100%	Xylol	3×	kurz

10xTBS-Puffer:

1M	Tris
1,5mM	NaCl
	ad H ₂ O _{demin.}

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

BSA-TBS-Stammlösung:

10%	BSA
	ad 1×TBS

Lösung bei -20°C lagern, Gebrauchslösung 1% (v/v) in 1×TBS ebenfalls bei -20°C lagern.

Trypsin-Lösung:

2,7mM	KCl
137mM	NaCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O
3,4 mM	EDTA×2H ₂ O
	ad H ₂ O _{demin.}

Den pH -Wert der Lösung mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren und danach 1,25g Trypsin (1:250, Difco, USA) zugeben.

4 Ergebnisse

4.1 Strategie zur Herstellung von mCMV-Rekombinanten mit orthotopem Austausch antigener Peptide

Virus-infizierte Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche virale Peptide, die von CD8 T-Zellen erkannt werden. Die Peptide werden nach ihrer zytosolischen Generierung im ER auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und im Komplex mit diesen an der Zelloberfläche präsentiert (siehe 1.6). Dort sind sie indirekt über die Messung von T-Zell Effektorfunktionen, z. B. im Zytolyse-Assay oder im *ELISpot-Assay*, sowie mittels Massenspektroskopie nach Extraktion der Peptide von der Zelloberfläche nachweisbar. Ein direkter Nachweis auf der Zelloberfläche gelingt nur in den Fällen, in denen ein für den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex spezifischer Antikörper verfügbar ist (Cohen et al., 2003a, b). Der Prototyp derartiger Antikörper ist der monoklonale Antikörper T-AG 25-D1.16 (Porgador et al., 1997), der spezifisch den vom antigenen Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) und dem MHC-Klasse-I-Molekül H2-K^b gebildeten Präsentationskomplex erkennt. Dies ist in sofern bedeutsam als das SIINFEKL-Peptid ein klassisches Modellpeptid für Untersuchungen der Prozessierung und Präsentation innerhalb des MHC-Klasse-I-*Pathway* der Antigenpräsentation darstellt (siehe 1.6.2) und somit nun Antikörper-basierten Nachweismethoden zugänglich ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die SIINFEKL-basierten Techniken für Untersuchungen im Rahmen der mCMV-Infektion zu nutzen. Hierzu wurden SIINFEKL-kodierende und exprimierende mCMV-Rekombinanten generiert.

Als Ort der SIINFEKL-Insertion wurde der virale ORF *m164* (Thäle et al., 1995) gewählt. Dieser ORF kodiert für das nichtessentielle *E*-Phase Protein m164/gp36,5, dessen biochemische Eigenschaften in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert worden sind (Däubner, 2007). Innerhalb des m164/gp36,5 sind mehrere T-Zell Epitope identifiziert worden; dazu gehören jeweils ein H2-D^d (m164₁₅₀₋₁₅₈), ein H2-D^b (m164₁₆₀₋₁₆₈), sowie ein H2-K^b (m164₁₈₀₋₈₈) restringiertes Peptid (Holtappels et al., 2006b). Das Peptid m164₁₅₀₋₁₅₈ induziert eine immundominante CTL-Antwort in Mäusen des Stammes BALB/c und ist das einzige bisher beschriebene Peptid, das der Kontrolle der vRAPs entgeht (Holtappels et al., 2002a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Position des m164₁₅₀₋₁₅₈-Peptids für einen sogenannten orthotopen Peptidaustausch gewählt. Dabei wird das ursprüngliche, viral kodierte Peptid deletiert und durch SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) ortstreu ersetzt (siehe Abb. 9). Der Vor-

teil dieser Strategie ist, dass das Trägerprotein weitestgehend unverändert bleibt und damit der Einfluss der Mutation auf die Infektion so gering wie möglich gehalten wird. Als Alternativen zum orthotopen Austausch wären noch die Integration von SIINFEKL mit flankierenden Sequenzen in das Trägerprotein m164/gp36,5 oder der Austausch eines nichtessentiellen Proteins wie z.B. m157 durch OVA denkbar. Hierdurch wäre es möglich das antigene Fremdpeptid in seiner ursprünglichen Sequenzumgebung zu exprimieren, allerdings würde gleichzeitig das mCMV-Genom deutlich stärker verändert.

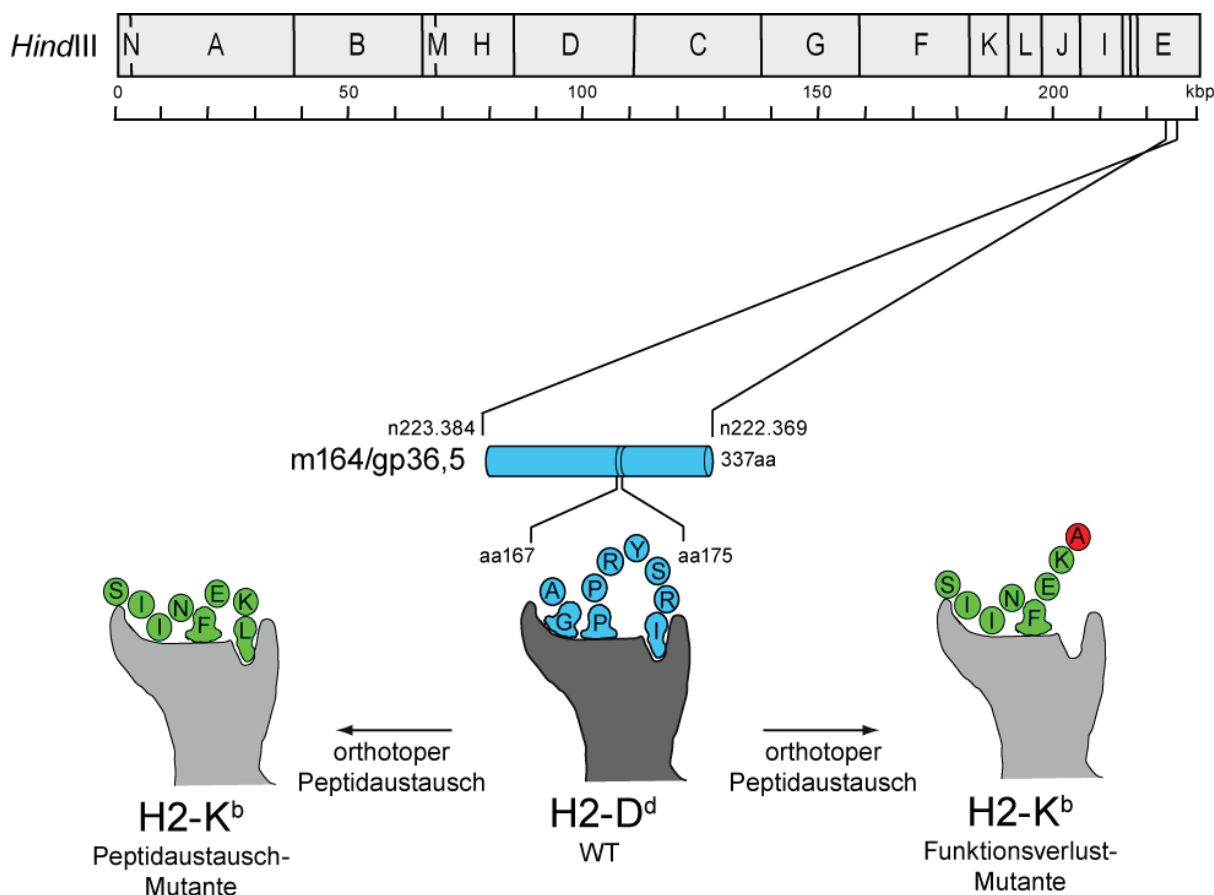


Abb. 9: Orthotoper Peptidaustausch des D^d restringierten Peptides m164₁₅₀₋₁₅₈ durch das K^b präsentierte Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ bzw. OVA_{257-264L→A}

HindIII-Karte des mCMV-WT-Genoms nach Rawlinson et al. (1996). Gezeigt ist die Lokalisation des Proteins m164/gp36,5 mit der Position des entsprechenden D^d restringierten CD8 T Zell-Epitops. Die geplanten orthotopen Peptidaustausche (m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA₂₅₇₋₂₆₄ bzw. m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA_{257-264L→A}) sorgen für die Präsentation des immundominanten K^b restringierten Peptids SIINFEKL bzw. für die fehlende Präsentation der Funktionsverlustmutante SIINFEKA.

Neben SIINFEKL exprimierenden mCMV-Rekombinanten wurden außerdem mCMV-Rekombinanten erstellt, die eine Funktionsverlustmutante des integrierten Peptids exprimieren. In diesen wurde selektiv die C-terminale Ankeraminosäure des SIINFEKL von Leucin nach Alanin (SIINFEKL→SIINFEKA) mutiert, so dass sowohl der proteasomale Schnitt als auch die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül weitgehend ausgeschaltet wird. Die

direkte Folge dieser Mutation ist die Verhinderung der Peptid-Präsentation (Simon et al., 2006).

Zusammenfassung: Die Sequenz des antigenen Peptids SIINFEKL sollte mittels orthotopen Peptidaustauschs an der Stelle des viralen Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ in das mCMV-Genom integriert werden.

4.2 Vorhersage der Peptid Generierung und MHC-Klasse-I-Bindung

Die Überprüfung des veränderten Trägerproteins m164/gp36,5 im Hinblick auf proteasomalen Schnitt und MHC-Bindung des generierten Peptids erfolgte *in silico* mit Hilfe von NetMHC 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., 2003; Nielsen et al., 2003) und RANKPEP (<http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP>) (Reche et al., 2002; 2004). Diese Programme berechnen über unterschiedliche Algorithmen Wahrscheinlichkeiten für den proteasomalen Schnitt (RANKPEP) und die MHC-Bindung (NetMHC und RANKPEP).

Die Resultate sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den Vorhersagen der Austausch der Ankeramino-säure Leucin gegen Alanin die Bindung des antigenen Peptids an MHC-Klasse-I deutlich schwächt. Dass eine Schwächung der Bindung mit einem Antigenitätsverlust einhergeht konnte für das L^d restringierte mCMV-IE1-Peptid (IE1₁₆₈₋₁₇₆) von Reddehase und Koszinowski (1991) sowie Rognan et al. (1992) gezeigt werden.

Tab. 5: Mittels NetMHC3.0 vorhergesagte Bindungseigenschaften der Peptide SIINFEKL und SIINFEKA an H2-K^b

Protein	Peptid	Vorhergesagte Affinität [nM]	Score
m164/gp36,5-SIINFEKL	SIINFEKL	20	1,126
m164/gp36,5-SIINFEKA	SIINFEKA	2367	0,440

Die Affinität gibt den IC₅₀ Wert an, wobei starke Bindungen einen IC₅₀ Wert von <50nM und schwache Bindungen einen Wert von >500nM haben. Der Score gibt einen Wert für die Wahrscheinlichkeit der Präsentation an.

Tab. 6: Mittels RANKPEP vorhergesagte Bindungen der Peptide SIINFEKL und SIINFEKA an H2-K^b

Protein	Peptid	Score
m164/gp36,5-SIINFEKL	SIINFEKL	101
m164/gp36,5-SIINFEKA	SIINFEKA	62

Die Vorhersage des Scores wird über eine PSSM (*Position specific scoring matrix*) errechnet. Der *Threshold* einer Bindung liegt bei einem Wert von 76, der Score für eine optimale Bindung ist 146.

Neben der Schwächung der MHC-Klasse-I-Bindung verändert der Aminosäureaustausch Leucin→Alanin auch die Wahrscheinlichkeit des C-terminalen Schnitts im Proteasom. Dieses lässt sich *in silico* mit NetChop3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>) zeigen (Keçsmir et al., 2002; Nielsen et al., 2005). Abb. 10 zeigt, dass der Austausch der C-terminalen Ankeraminoäure zu einer Deletion der proteasomalen Schnittstelle führt.

```

-----
336 m164_gp36,
MLALIYAAASAAGTASASAVGSCVDGVLSDNCMKIYPDQDKAAVICHVKPGSVKKFVGWSWFALPEGRDFQTTTIATFD
.....S..S.....S.....SS.....SS.....S.S..S.S.S.....SS.S.
AESFHIHVAGFTGMADALSMTELWPPSGFSGLVVCDIDHVSQAMCLIPFLLRWVPGEELLTIEPVVPAEAPFGKDYC
S.....S.SS.....S.....S.SS.....SS.....S.....SSSS.....SS.S.....S.....S.
RTWGADSIINFEKLEFVAVNNQAIVAAGEETLGTDFLWMSNRLEGFTVNASDLALSFPPIRSDLFVCVSCVVGSGGNLSSL
S.S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.S.S.S.S.....S.S.S.....S.S
PTIECRPVHVARSTGSKSCDCQLERFLAAFVVMCLITIVTVYIYLVSDVRPSLFPTFEIRYFTGGVPVNGVVSRRHQ
..S.....S.SS.....S.....S.....S.....SSSS.....S.....S.SSS.....S.....S.S...
PWRAATNASSRVGRSS
.S.....S.....S.....
-----

Number of cleavage sites 85. Number of amino acids 336. Protein name m164_gp36,

-----
336 m164_gp36,
MLALIYAAASAAGTASASAVGSCVDGVLSDNCMKIYPDQDKAAVICHVKPGSVKKFVGWSWFALPEGRDFQTTTIATFD
.....S..S.....S.....S.....SS.....SS.....S.S..S.S.S.....SS.S.
AESFHIHVAGFTGMADALSMTELWPPSGFSGLVVCDIDHVSQAMCLIPFLLRWVPGEELLTIEPVVPAEAPFGKDYC
S.....S.SS.....S.....S.SS.....SS.....S.....SSSS.....SS.S.....S.....S.
RTWGADSIINFEKAFVAVNNQAIVAAGEETLGTDFLWMSNRLEGFTVNASDLALSFPPIRSDLFVCVSCVVGSGGNLSSL
S.S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.....S.S.S.S.S.....S.S.S.....S.S
PTIECRPVHVARSTGSKSCDCQLERFLAAFVVMCLITIVTVYIYLVSDVRPSLFPTFEIRYFTGGVPVNGVVSRRHQ
..S.....S.SS.....S.....S.....S.....SSSS.....S.....S.SSS.....S.....S.S...
PWRAATNASSRVGRSS
.S.....S.....S.....
-----

Number of cleavage sites 84. Number of amino acids 336. Protein name m164 gp36,

```

Abb. 10: Vergleich des proteasomalen C-terminalen Schnitts von m164/gp36,5-SIINFEKL und m164/gp36,5-SIINFEKA

Die Vorhersage erfolgte mittels „C-Term 3“ *Prediction* und einem Threshold von 0,7. Zu sehen ist, dass der N-terminale Schnitt bei SIINFEKL hinter dem Leucin (L) stattfindet, während SIINFEKA nicht hinter dem Alanin (A) geschnitten wird. S markiert vorhergesagte proteasomale Schnittstellen

Zusammenfassung: Die gewählten *in silico* Vorhersagen zeigen dass die Strategie des orthotopen Peptidaustausch am Integrationsort m164₁₅₀₋₁₅₈ mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einer proteasomalen Prozessierung und anschließenden Präsentation von SIINFEKL führt. Ein zu SIINFEKA verändertes Peptid sollte hingegen nicht präsentiert werden.

4.3 Generierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide durch Zwei-Schritt-Rekombination in *E. coli*

Der orthotope Austausch des D^d restringierten Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ gegen das K^b restringierte Peptid SIINFEKL bzw. gegen das nichtfunktionelle Peptid SIINFEKA wurden mittels Zwei-Schritt BAC-Mutagenese durchgeführt. Mit dieser Technik können mittels homologer Rekombinationen basengenau Mutationen in ein BAC eingebracht werden, ohne dass Selektionsmarker oder andere verunreinigende Sequenzen im BAC zurückbleiben.

Zunächst wurde ein *Shuttle*-Vektor, der die Sequenz des auszutauschenden Peptids (SIINFEKL bzw. SIINFEKA) und die die Insertionsstelle flankierenden viralen Homologien aus dem mCMV-Genom bereitstellt, generiert. Als *Shuttle*-Vektor kam der Vektor pST76K_SR (Pósfai et al., 1997; Borst et al., 2004b) zum Einsatz (siehe Abb. 11). Dieser besitzt ein temperatur-sensitives Replikon, das die Replikation auf Temperaturen unter 30°C limitiert. Außerdem kodiert er für die Gene der *RecA*-Rekombinase, welche die Mutagenese in *RecA*-negativen *E. coli* Stämmen wie beispielsweise DH10B ermöglicht, für *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase, *Kan^{Res}*), sowie für *SacB*, das Exoenzym Levan-Saccharase aus *Bacillus subtilis* (Blomfield et al., 1991; Borst et al., 2004b).

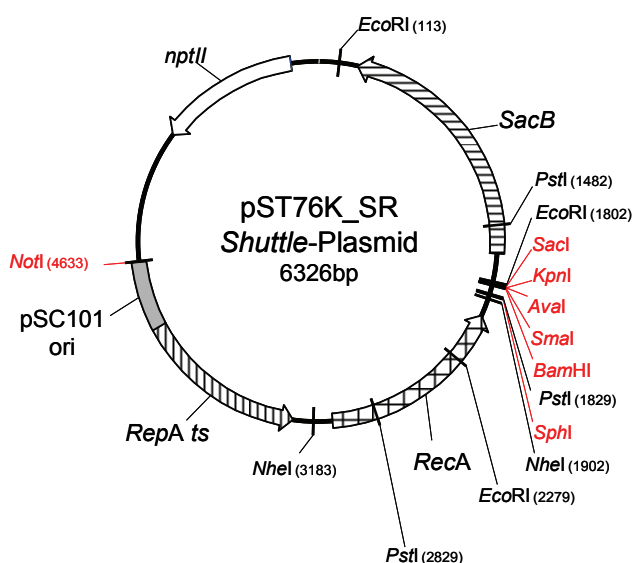


Abb. 11: Schematische Darstellung des *Shuttle*-Vektors pST76K_SR.

Das *low-copy* Plasmid trägt den temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 ori. Es kodiert für die während der Mutagenese benötigten Gene *RecA* (Rekombinase), *nptII* (*Kan^{Res}*), *RepA ts* (Replikations-Initiator-Protein mit Punktmutation, das bei Temperaturen $\geq 37^{\circ}\text{C}$ durch Fehlfaltung inaktiviert wird) sowie *SacB* (Levan-Saccharase aus *B. subtilis*). Singuläre Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind rot dargestellt (entnommen aus C. Simon; Doktorarbeit).

Nach Transformation von *E. coli*), die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthalten mit dem jeweiligen *Shuttle*-Plasmid, erfolgt über eine der beiden flankierenden Homologien die Rekombination und die Bildung eines Cointegrates aus dem BAC- und dem *Shuttle*-Plasmid. Durch Kultivierung bei 43°C werden nicht-rekombinierte *Shuttle*-Plasmide aus dem Ansatz entfernt. Die erneute homologe Rekombination zwischen zwei identischen, flankierenden Homologien sorgt für die Auflösung der Cointegrate. Dabei entsteht entweder ein mCMV-BAC-WT-Plasmid oder ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid mit der gewünschten Mutation. Durch die anschließende Kultivierung der Bakterien auf 5% Saccharose werden aufgelöste Cointegrate angereichert, da Bakterien mit nicht aufgelösten Cointegraten die von *SacB* kodierte Levan-Saccharase exprimieren und somit Saccharose zur toxischen Levan-Saccharose umsetzen (Blomfield et al., 1991). Hierdurch erhöht sich die Ausbeute für erfolgreich mutierte mCMV-BAC-Plasmide von 2,5% auf 50% (Wagner et al., 1999). Die Identifikation der erfolgreich generierten Rekombinanten erfolgt abschließend über Restriktionsanalysen und Sequenzierung. Für eine schematische Darstellung der Zwei-Schritt-BAC-Mutagenese siehe Abb. 12.

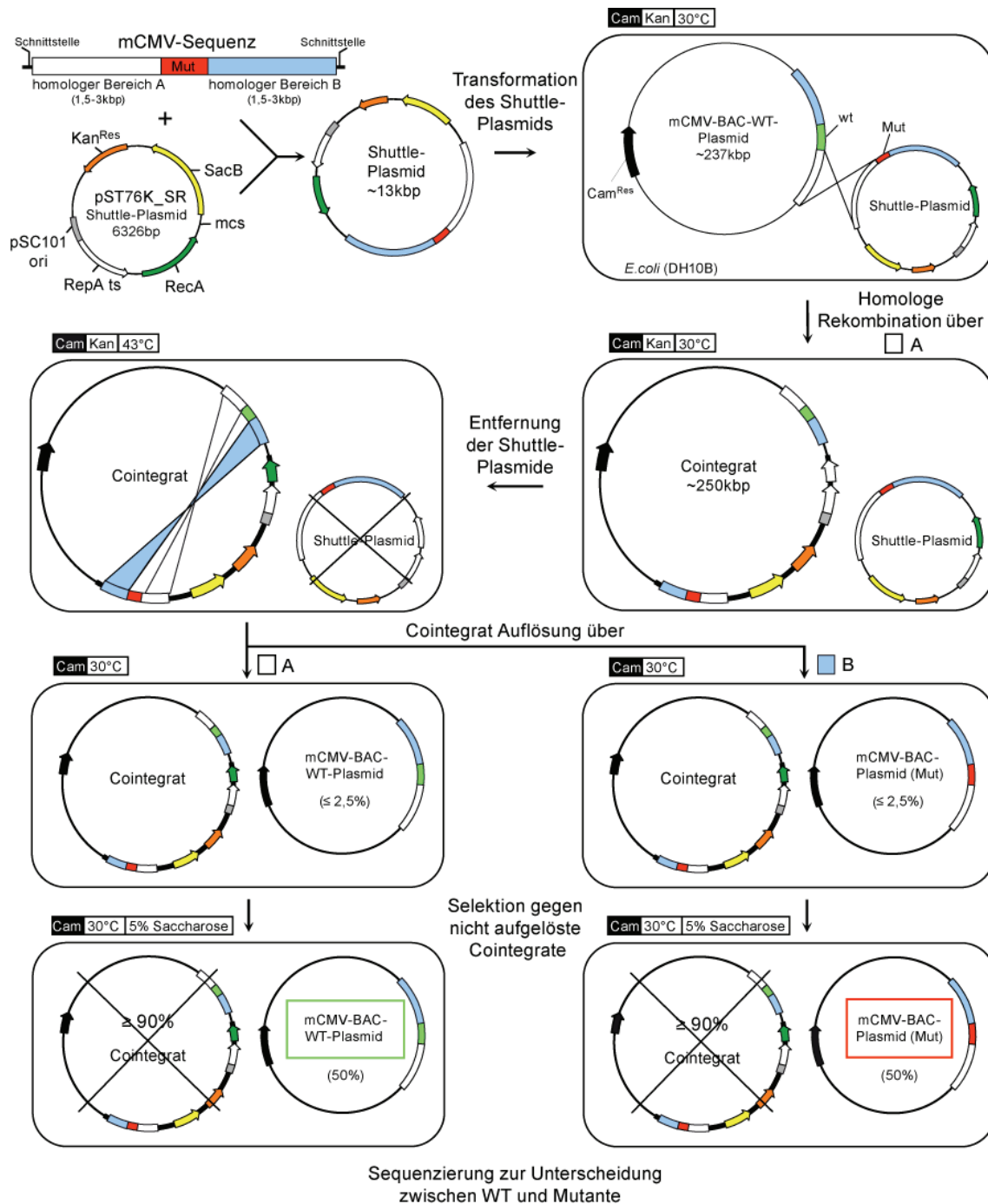


Abb. 12: Schema der Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Zwei-Schritt-Rekombination (verändert nach C. Simon).

Nach Subklonierung der mutierten viralen Sequenz mit flankierenden Sequenzen der Insertionstelle in das *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR werden mit diesem mCMV-BAC-WT tragende *E. coli* transformiert. Während der Inkubation wird das *RecA*-Protein exprimiert, das die homologe Rekombination katalysiert. Auf das entstehende Cointegrat wird mit Hilfe von Kanamycin (Kan) und Chloramphenicol (Cam) selektioniert. Eine folgende Inkubation bei 43°C verhindert die Replikation der *Shuttle*-Plasmide, so dass diese aus dem Ansatz entfernt werden. Während der Inkubation bei 30°C kann eine zweite homologe Rekombination erfolgen, bei der entweder wieder ein mCMV-BAC-WT gebildet wird (Rekombination über Homologie-Paar A) oder ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid (Mut) mit der gesetzten Mutation entsteht (Rekombination über B). Zur Erhöhung der Ausbeute an aufgelösten Cointegraten wird mit 5% Saccharose gegen nicht-aufgelöste Cointegrate (mit *SacB*-Gen) selektioniert.

4.3.1 Klonierung des *Shuttle*-Vektors pST76-m164-SIINFEKL

Bei der Generierung des rekombinanten SIINFEKL-*Shuttles* konnte auf das Ausgangskonstrukt **pBlue_m164ausC3X** zurückgegriffen werden, das von Holtappels et al. (2008) beschrieben wurde. Dieses Plasmid beinhaltet die mittels PCR amplifizierte mCMV-Sequenz zwischen den Nukleotiden 220.441 und 225.678 (alle Sequenzangaben, wenn nicht anders angegeben, nach Rawlinson et al., 1996) und stellt die für die Rekombination benötigten flankierenden homologen Sequenzen zu jeder Seite des Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ (222.855 bis 222.881) (Holtappels et al., 2002a; b) bereit.

Im Zwischenkonstrukt 1 **pBlue_m164-SIINFEKL** wurde die Sequenz des Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ orthotop gegen das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) ausgetauscht. Dafür wurde in einer Kombinations-PCR (siehe 3.5.11.2) ein 1.367bp großes Fragment (KF1) erzeugt, das den Peptidaustausch m164₁₅₀₋₁₅₈ → OVA₂₅₇₋₂₆₄ enthält. Im Ausgangskonstrukt pBlue_m164

ausC3X wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Nco*I und *Age*I 1.291bp virale Sequenz, die u. a. die Sequenz des antigene Peptids beeinhaltet, deletiert und im Anschluss das gleichfalls geschnittene Fragment KF1, in das geöffnete Ausgangskonstrukt ligiert. Damit entstand das Zwischenkonstrukt 1 pBlue_m164-SIINFEKL (siehe Tab. 7).

Das *Shuttle*-Plasmid **pST76K_m164-SIINFEKL** resultierte aus der Subklonierung eines 5.239bp *Hpa*I und *Sph*I Fragments aus pBlue_m164-SIINFEKL in das mit *Sma*I und *Sph*I geöffnete *Shuttle*-Plasmid **pST76K_SR** (siehe Abb. 13).

Tab. 7: Auflistung der Kombinations-PCRs zur Herstellung der *Shuttle*-Plasmide

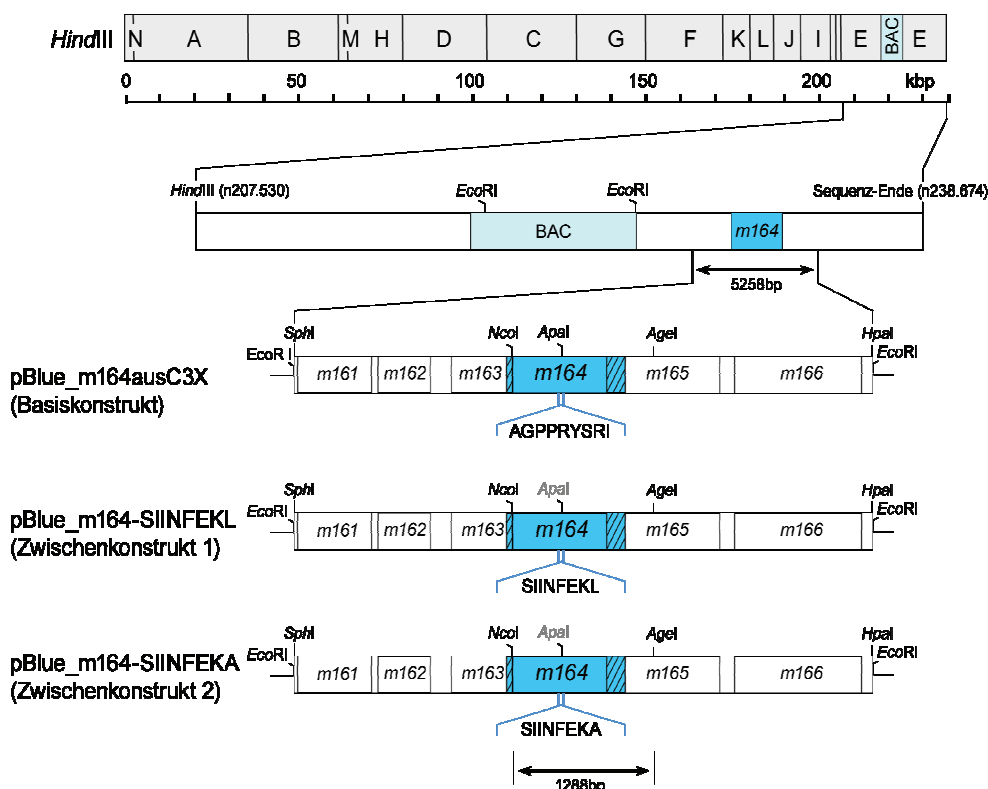
PCR	Matrize	Primer1	Primer2	Annealing	A	Restriktion	KF
1	pBlue_m164ausC3X	m164mut_rev	m164_SIINFEKL_for	60°C	A1 490bp		
2	pBlue_m164ausC3X	m164_SIINFEKL_rev	m164mut_for	60°C	A2 898bp		
3	A1 und A2	m164mut_rev	m164mut_for	60°C	A3 1.367bp	<i>Age</i> I/ <i>Nco</i> I	KF1
4	pBlue_m164ausC3X	m164mut_rev	m164_SIINFEKA_for	60°C	A4 490bp		
5	pBlue_m164ausC3X	m164_SIINFEKA_rev	m164mut_for	60°C	A5 898bp		
6	A4 und A5	m164mut_rev	m164mut_for	60°C	A6 1.367bp	<i>Age</i> I/ <i>Nco</i> I	KF2

PCR-Oligonukleotide für die gerichtete PCR-Mutagenese (siehe 2.1.6), Kombinations-PCR (siehe 3.5.11.2)
A, Amplifikat; KF, Kombinations-PCR-Fragment

4.3.2 Klonierung des *Shuttle*-Vektors pST76-m164-SIINFEKA

Die Generierung des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_m164-SIINFEKA** erfolgte analog zur Herstellung von pST76K_m164-SIINFEKL (siehe 4.2.2). Auch hier wurde zunächst das Zwischenkonstrukt 2 **pBlue_m164-SIINFEKA** mittels Klonierung von KF2 generiert. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Subklonierung eines 5.239bp großen, mit *HpaI* und *SphI* geschnittenen Fragments in das mit *SmaI* und *SphI* geöffnete *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR; es entstand das *Shuttle*-Plasmid pST76K_m164-SIINFEKA (siehe Tab. 7).

A



B

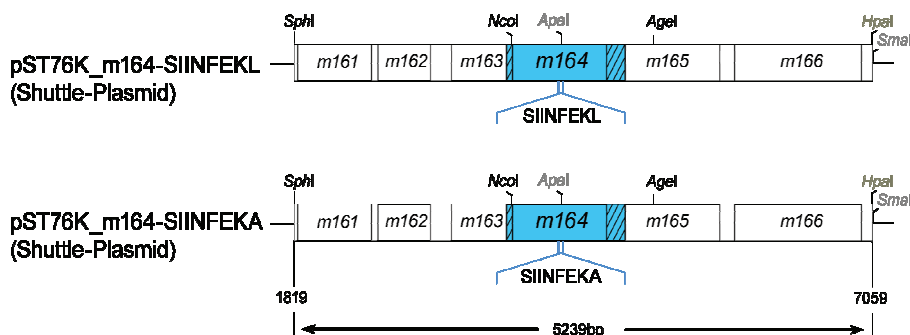


Abb. 13: Konstruktion rekombinanter *Shuttle*-Plasmide

A *HindIII*-Karte des mCMV-BAC-WT Genoms mit Ausschnitt des terminalen E-Fragments und der dort lokalisierten BAC-Vektor Sequenz (türkis) sowie der ORFs *m161* bis *m166*. Der ORF *m164* ist blau, seine Überlappungen mit den ORFs *m163* und *m165* schraffiert dargestellt. Gezeigt ist das Basiskonstrukt pBlue_m164ausC3X mit dem antigenen Peptid m164₁₅₀₋₁₅₈. Aus diesem wurde durch Restriktion mit *NcoI* und

Agel ein 1.291bp langes Fragment entfernt. Im Anschluss wurde in das Basiskonstrukt ein mittels Rekombinations-PCR erstelltes 1.367bp Fragment (1.288bp nach Restriktion), das die orthotopen Austausche (m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA₂₅₇₋₂₆₄) bzw. (m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA_{257-264L₃A}) enthält, eingefügt. Aus dieser Ligation resultieren die Zwischenkonstrukte pBlue_m164-SIINFEKL bzw. pBlue_m164-SIINFEKA.

B Die *Shuttle* Plasmide pST76K_m164-SIINFEKL bzw. pST76K_m164-SIINFEKA entstanden durch Subklonierung eines 5.239bp langen Fragments aus den Zwischenkonstrukten 1 bzw. 2 in den Vektor pST76K_SR. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Hellgraue Restriktionsschnittstellen sind durch die Subklonierung deletiert. (Abbildung verändert nach C. O. Simon)

4.3.3 Charakterisierung der rekombinanten *Shuttle*-Plasmide

Vor ihrer Verwendung in der Zwei-Schritt-Rekombination wurden die *Shuttle*-Plasmide im Restriktionsverdau und durch Sequenzierung auf die korrekte Integration des für SIINFEKL bzw. SIINFEKA kodierenden *Inserts* hin untersucht.

Durch den Austausch von m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA₂₅₇₋₂₆₄, wurde eine *Apal* Schnittstelle im ORF*m164* deletiert, so dass die erfolgreiche Integration einfach zu überprüfen ist. Die durch Restriktion mit *NcoI*, *SacI*, bzw. *SphI* und *Apal* resultierenden theoretischen Fragmentgrößen sind in Tab. 8 aufgelistet. Nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung der geschnittenen Plasmide konnten die erwarteten DNA-Fragmente nachgewiesen werden (siehe Abb. 14).

Tab. 8: Restriktions-Analyse der klonierten m164-*Shuttle*-Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Fragmente [kbp]		
		<i>SacI</i>	<i>NcoI</i>	<i>SphI</i> + <i>Apal</i>
pST76K_SR	6.326	6,3	3,7; 2,4; 0,2	6,3
pST76K_m164	11.513	8,8; 2,7	5,8; 3,1; 2,4; 0,2	9,1; 1,7; 0,7
pST76K_m164-SIINFEKL	11.510	8,8; 2,7	5,8; 3,1; 2,4; 0,2	10,8; 0,7
pST76K_m164-SIINFEKA	11.510	8,8; 2,7	5,8; 3,1; 2,4; 0,2	10,8; 0,7

Für die folgende Überprüfung der integrierten Sequenzabschnitte wurden jeweils 5 Klone der Plasmide pST76K_m164-SIINFEKL bzw. pST76K_m164-SIINFEKA von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Als Primer dienten m164-seq-rev bzw. m164-seq-for (*Annealing*: 58°C). Bei allen sequenzierten Klonen konnte der mittels Kombinations-PCR eingefügte Peptidaustausch auf beiden DNA-Strängen bestätigt werden. Zusätzlich ist der von in der Doktorarbeit von C. O. Simon beschriebene stille Basenaustausch an Nukleotidposition 222.666 CTG→CTA bestätigt worden.

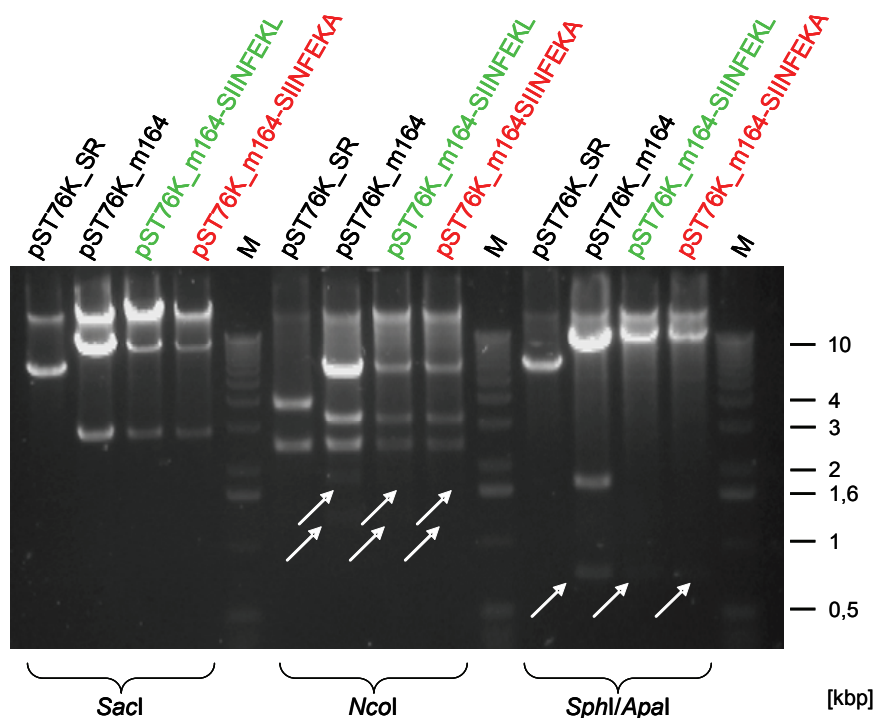


Abb. 14: Auftrennung der generierten *Shuttle*-Plasmide nach Restriktionsverdau.

Restriktionsverdau der hergestellten *Shuttle*-Plasmide mit *SacI*, *NcoI* bzw. *SphI/ApaI*. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden entsprechen den berechneten Größen. Als Kontrolle wurden die Vektoren pST76K_SR sowie pST76K_m164 mitgeführt. Spur M: 1kbp Marker, die Pfeile markieren schwache Banden.

Zusammenfassung: Die Klonierung der für die homologe Rekombination benötigten *Shuttle*-Plasmide konnte erfolgreich realisiert werden. Damit standen die *Shuttle*-Plasmide pST76K_m164-SIINFEKL und pST76K_m164-SIINFEKA zur homologen Rekombination im Verlauf der BAC-Mutagenese zur Verfügung.

4.4 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide

Nach erfolgreicher Klonierung und Charakterisierung des SIINFEKL- und des SIINFEKA-*Shuttle*-Plasmids konnten beide zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels homologer Rekombination im Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren (siehe 3.5.12.1). eingesetzt werden. Dabei wurden als Ausgangskonstrukt entweder das die beiden vRAPs m06/gp48 und m152/gp40 exprimierende mCMV-BAC-WT (**mCMV-BAC-vRAP**) oder das vRAP Deletionskonstrukt mCMV-BAC- Δ m06/ Δ m152 (**mCMV-BAC- Δ vRAP**) verwendet. Ziel war es basierend auf diesen Ausgangskonstrukten jeweils eine SIINFEKL bzw. SIINFEKA exprimierende mCMV-Rekombinante zu erstellen.

4.4.1 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-SIINFEKL-Plasmide

Das rekombinante Plasmid mCMV-BAC-m164-SIINFEKL (**mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL**) entstand durch homologe Rekombinationen nach Transformation des *Shuttle*-Plasmids pST76K_m164-SIINFEKL in elektrokompente *E. coli*, die bereits das BAC-Plasmid mCMV-BAC-vRAP trugen. Das nachfolgend isolierte mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL beinhaltet den orthotopen Peptidaustausch m164₁₅₀₋₁₅₈→OVA₂₅₇₋₂₆₄ und kodiert damit für das antigene Peptid SIINFEKL.

Im Anschluss gelang auch die Herstellung des Plasmids mCMV-BAC- Δ m06/ Δ m152-SIINFEKL (**mCMV-BAC- Δ vRAP-SIINFEKL**) nach Transformation des *Shuttle*-Plasmids pST76K_m164-SIINFEKL in elektrokompente *E. coli*, die das Plasmid mCMV-BAC- Δ vRAP enthielten. Das so generierte rekombinante BAC-Plasmid kodiert gleichfalls für das antigene Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext der Deletionen der vRAPs m06/gp48 und m152/gp40 (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Übersicht der generierten m164-SIINFEKL-BAC-Plasmide

<i>Shuttle</i> -Plasmid	Ausgangs-Plasmid	Rekombinantes BAC-Plasmid
pST76K_m164-SIINFEKL	C3X (mCMV-BAC-vRAP)	mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL
pST76K_m164-SIINFEKL	mCMV-BAC- Δ m06/ Δ m152 (mCMV-BAC- Δ vRAP)	mCMV-BAC- Δ vRAP-SIINFEKL

4.4.2 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-SIINFEKA-Plasmide

Die Generierung der rekombinanten Plasmide mCMV-BAC-m164-SIINFEKA (**mCMV-vRAP-SIINFEKA**) und mCMV-BAC- Δ m06/ Δ m152-m164-SIINFEKA (**mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA**) erfolgte analog zu 4.4.1 unter Verwendung des Plasmids pST76K_m164-SIINFEKA als Shuttle. Die so generierten Plasmide kodieren für die „*loss of function*“ Mutante des antigenen Peptids SIINFEKL mit der Sequenz SIINFEKA an der Stelle des m164₁₅₀₋₁₅₈ (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Übersicht der generierten m164-SIINFEKA-BAC-Plasmide

Shuttle-Plasmid	Ausgangs-BAC-Plasmid	Rekombinantes BAC-Plasmid
pST76K_m164-SIINFEKA	C3X (mCMV-BAC-vRAP)	mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL
pST76K_m164-SIINFEKA	mCMV-BAC- Δ m06/ Δ m152 (mCMV-BAC- Δ vRAP)	mCMV-BAC- Δ vRAP-SIINFEKL

4.4.3 Molekulare Charakterisierung der hergestellten mCMV-BAC-Plasmide

Die in 4.4.1 und 4.4.2 generierten BAC-Plasmide waren im Anschluss molekular zu charakterisieren. Dabei wurde mittels Restriktionsanalyse die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb der BAC-Plasmide nach erfolgreicher homologer Rekombination nachgewiesen. Im Anschluss daran wurde eine PCR über die Insertionsstelle etabliert und im erhaltenen PCR-Produkt durch Restriktionsanalyse sowie durch Sequenzierung der orthotope Peptidaustausch bestätigt.

4.4.3.1 Restriktionsanalyse

Die BAC-Vektorsequenz ist im mCMV-BAC-Plasmid C3X von zwei 533bp langen Sequenz-Wiederholungen viralen Ursprungs flankiert (Wagner et al., 1999). Über diese kann mittels Rekombination in eukaryotischen Zellen während der Virusrekonstitution der BAC-Vektoranteil deletiert werden. Diese Rekombination ist allerdings auch spontan in prokaryotischen Zellen möglich, so dass es hier zum Verlust des mCMV-Genoms aus dem BAC-Plasmid kommen kann. Zusätzlich können weitere unerwünschte Rekombinationen durch RecA katalysiert werden und somit zu Deletionen innerhalb des mCMV-Genoms führen.

Es ist deshalb notwendig, die Integrität der BAC-Plasmide zu überprüfen. Dazu wurde nach Abschluss der Zwei-Schritt-Mutagenese (siehe 3.5.12.1) von 10 bis 20 Kan-sensitiven Klonen die BAC-DNA isoliert und mit *EcoRI* verdaut. Nach der Auftrennung der DNA

im Agarose-Gel ließen sich die typischen Bandenmuster der Klone darstellen. Für Klone, die nach Rekombination nur noch BAC-Vektor enthalten, stellten sich Banden von 1,93kbp und 6,45kbp Länge dar (siehe Klon #9 in Abb. 15).

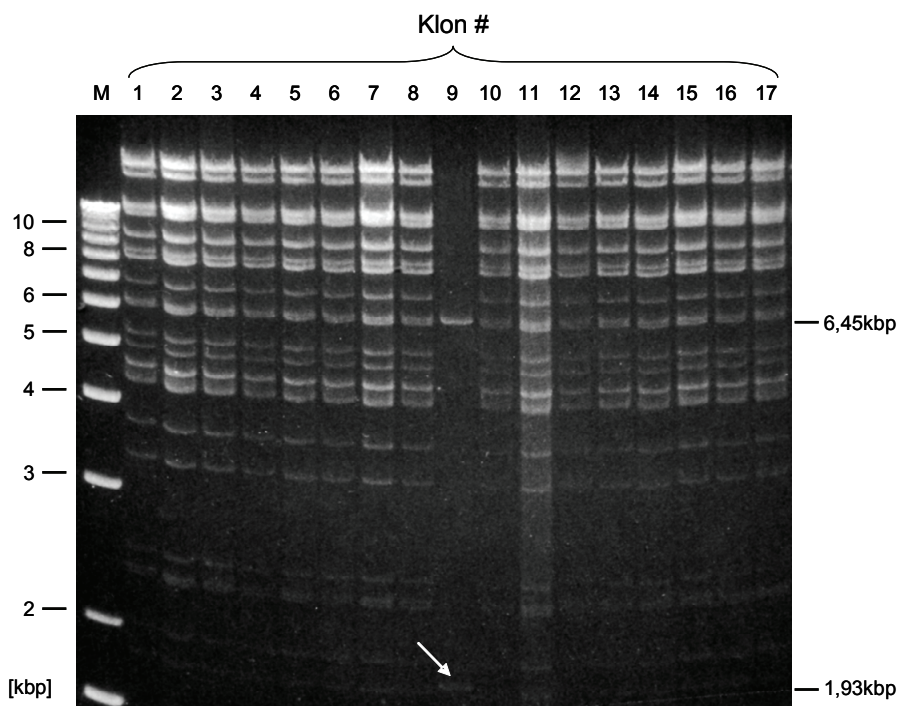


Abb. 15: Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in *E. coli*.

Die Überprüfung der Integrität der BAC-Plasmide nach Zwei-Schritt-Mutagenese ist am Beispiel von mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL (Klone #1-17) gezeigt. Mit *EcoRI* verdaute BAC-DNA (BAC-Minipräparation) wurde in einem 0,7% Agarose-Gel aufgetrennt. Alle Klone bis auf Klon #9 zeigen das für mCMV-BAC-WT typische Bandenmuster. Im Klon #9 kam es zum Verlust der mCMV-Sequenz, so dass nur die typischen Vektorbanden bei 1,93kbp und 6,45kbp sichtbar sind. Spur M, 1kbp Marker.

4.4.3.2 Analyse des orthotopen Peptidaustausches

In Schritt III der Zwei-Schritt-Rekombination sollten sich die Cointegrate idealerweise äquimolar nach BAC-WT und BAC-mut auflösen (siehe 3.5.12.1 und Abb. 12). Im Normalfall können diese beiden Spezies durch Restriktionsverdau nicht voneinander unterschieden werden, mit der Folge, dass eine Sequenzierung der erhaltenen Kan-sensitiven Klone notwendig ist. Im Falle des orthotopen Peptidaustausches $m164_{150-158} \rightarrow OVA_{257-264}$ bzw. $m164_{150-158} \rightarrow OVA_{257-264L \rightarrow A}$ wurde jedoch eine *Apal*-Schnittstelle deletiert, so dass zwischen BAC-WT und BAC-mut auch durch Restriktionsanalyse unterschieden werden kann. Das hierfür einzusetzende PCR-Fragment musste zuvor aus BAC-Minipräparations-DNA der in 4.4.3.1 überprüften Klone amplifiziert werden. Diese Amplifikation ist essentiell, da mCMV-BAC-Plasmide auf Grund ihrer Größe eine Vielzahl von *Apal*-Schnittstellen enthalten.

In der PCR konnte mit dem Oligonukleotid-Paar m164sonde_rev / m164sonde_fwd (*Annealing*: 55°C) ein 858bp Fragment, das die DNA-Sequenz des Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ bzw. des orthotopen Austauschs beinhaltet, amplifiziert werden. Um das PCR-Fragment später sequenzieren zu können wurde zur Verringerung der Fehlerrate eine *proofreading* DNA-Polymerase in der PCR eingesetzt (siehe 3.5.11).

Zunächst wurde das erhaltene PCR-Fragment mit *Apal* restringiert. Als Kontrolle diente der Restriktionsverdau einer PCR, in der mCMV-BAC-vRAP als Template eingesetzt wurde. Nach anschließender Auftrennung im Agarose-Gel konnte nach erfolgreicher Mutagenese nur eine Bande (858bp) aufgetrennt werden, im Gegensatz dazu waren in der Kontrolle bzw. bei Auflösung zu BAC-WT zwei Banden (353bp bzw. 515bp) nachweisbar (siehe Abb. 16).

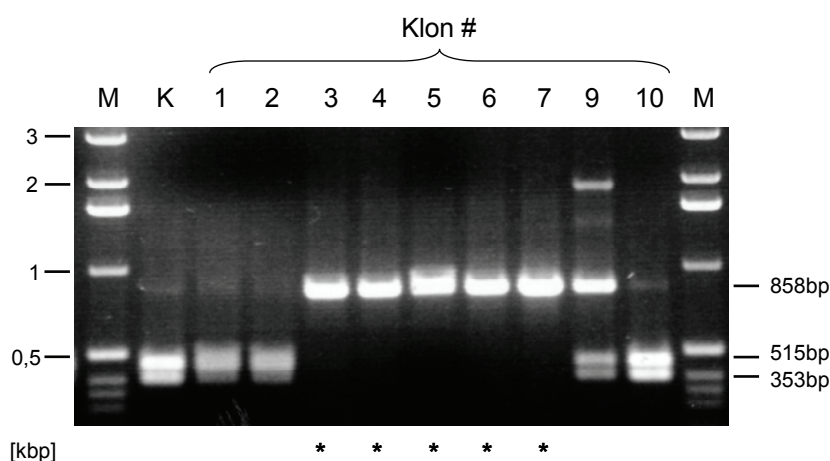


Abb. 16: Auftrennung von *Apal* restringierten PCR-Fragmenten

Exemplarische Darstellung des Nachweises der Deletion der *Apal*-Schnittstelle nach orthotopem Sequenzaustausch. Das durch PCR erhaltene 858bp Fragment wurde mit *Apal* restringiert und der Ansatz in einem 1%igem Agarose-Gel aufgetrennt. In den Klonen #3-7 (*) konnte die Schnittstelle erfolgreich deletiert werden. K zeigt die Restriktion einer PCR mit mCMV-BAC-vRAP als Template.

Zur Bestätigung des positiven Restriktionsverdaus und zur Kontrolle auf unerwünschte Nukleotidaustausche wurden die Amplifikate der im Restriktionsverdau positiv getesteten Klone sequenziert. Die Sequenzierreaktion und Sequenzbestimmung erfolgte bei GATC (Konstanz) mit den Sequenzier-Oligonukleotiden m164_seq_for bzw. m164_seq_rev, so dass sowohl der *sense* als auch der *antisense* Strang der DNA überprüft werden konnte. Abb. 17 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Chromatogramme zweier Rekombinanten im Vergleich zu einer WT Sequenzierung.

Im Anschluss an die Sequenzierung wurde aus den generierten Rekombinanten die BAC-DNA mittels Maxi-Präparation isoliert (siehe 3.5.10.7), die Qualität der DNA im Restriktionsverdau überprüft und schließlich die DNA zur Virusrekonstitution in MEF transfiziert (siehe 3.1.4).

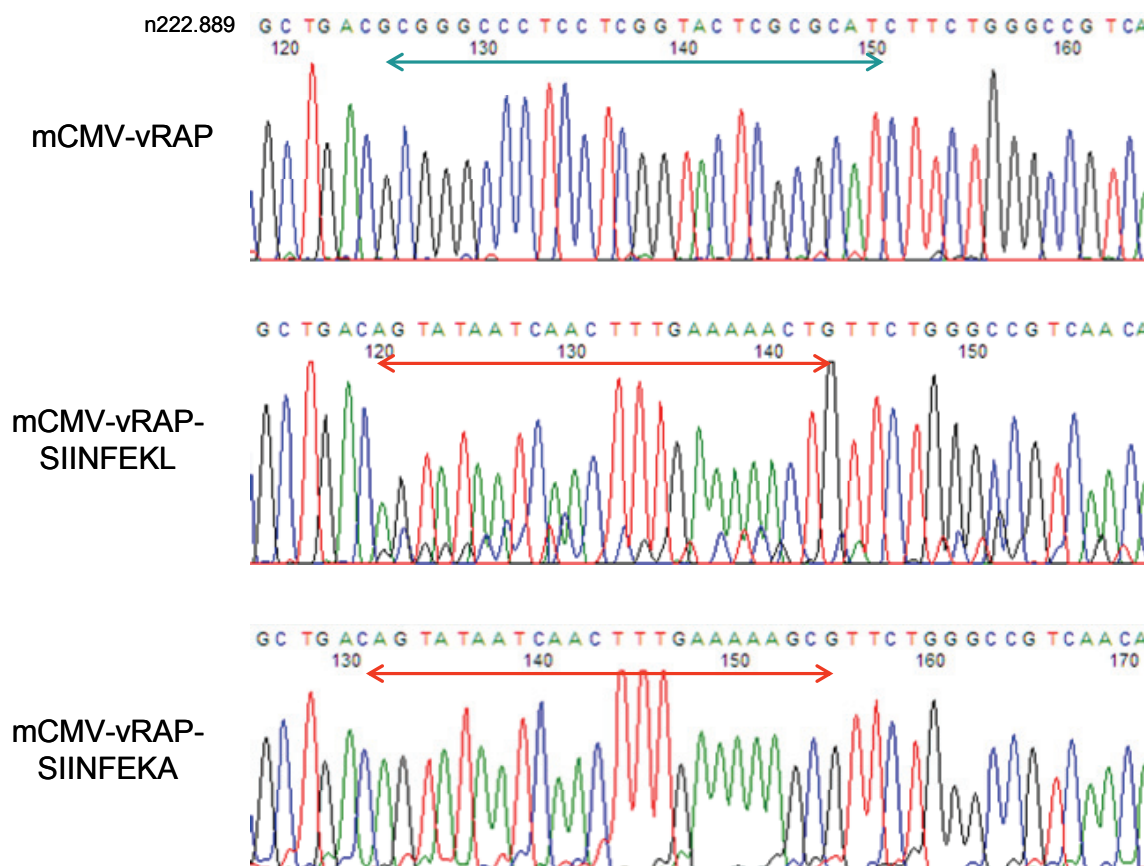


Abb. 17: Chromatogramme der Sequenzierungen von mCMV-vRAP, mCMV-vRAP-SIINFEKL, und mCMV-vRAP-SIINFEKA.

Zur Überprüfung des korrekten orthotopen Austausches $m164_{150-158} \rightarrow OVA_{257-264}$ erfolgte die Sequenzierung mehrerer BAC-Klone (5-10 Klone je Ansatz). Hier ist exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung dargestellt, das mit dem Oligonukleotid m164_seq_for erhalten worden ist. Die Chromatogramme zeigen den Bereich ab Nukleotidposition n222.889 (nach Rawlinson et al., 1996). Dabei ist die für das antigene Peptid $m164_{150-158}$ kodierende Sequenz mit einem blauen Pfeil markiert; die Sequenzen der orthotopen Austausche sind jeweils mit einem roten Pfeil markiert.

Die Abb. 18 zeigt eine Übersicht aller generierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide nach Kontrollrestriktionen mit *EcoRI*. Im Bandenmuster waren keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Ausgangsplasmiden (mCMV-BAC-vRAP bzw. mCMV-BAC- Δ vRAP) und den daraus hervorgegangenen Rekombinanten zu erkennen. Damit konnte gezeigt werden, dass es während der Mutagenese nicht zu ungewollten Rekombinationen innerhalb des mCMV-Genoms gekommen ist. Somit waren die jeweiligen BAC-DNAs zur Generierung rekombinanter Viren geeignet.

Zusammenfassung: Mit Hilfe des Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren konnten die in den Tabellen 9 und 10 aufgeführten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide generiert werden. Der jeweilige orthotope Peptidaustausch innerhalb des ORFs m164 konnte durch Sequenz-Analyse verifiziert werden. Die Bestätigung der Integrität der generierten mCMV-BAC-Plasmide erfolgte mittels Restriktions-Analyse.

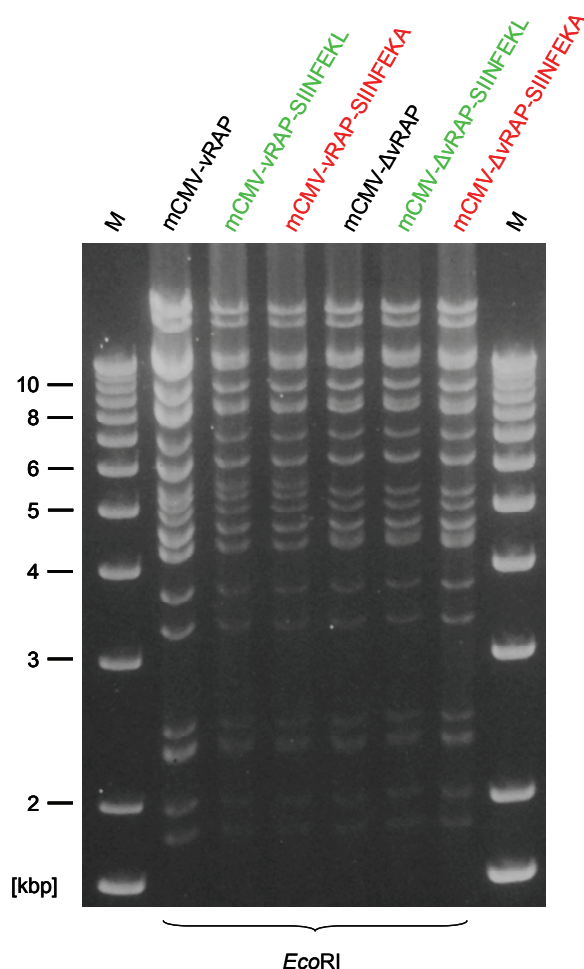


Abb. 18: Übersicht der generierten rekombinanten BAC-Plasmide

Gel-elektrophoretische Auftrennung mit *EcoRI* restringierter BAC-DNA aus BAC-Maxipräparationen der generierten Rekombinanten und ihrer jeweiligen Ausgangsplasmide (mCMV-vRAP bzw. mCMV-ΔvRAP) in einem 0,7% TBE Agarose-Gel. Spur M: 1kbp Marker.

4.4.4 Herstellung rekombinanter mCMV aus mCMV-BAC-Plasmid-DNA

Die Rekonstitution der rekombinanten Viren aus der aufgereinigten mCMV-BAC-DNA findet in C57BL/6 MEF statt. Dazu wurden zu ca. 70% konfluente MEF mittels PolyFect mit der entsprechenden BAC-DNA transfiziert (siehe 3.1.4). Durch die hohe Viskosität der BAC-DNA ist keine photometrische Quantifizierung der DNA-Konzentration möglich. Da-

mit lässt sich kein definiertes DNA zu PolyFect Verhältnis im Transfektionsansatz einsetzen. Um dennoch aussagekräftige Transfektionsergebnisse erhalten zu können, wurde die BAC-DNA in verschiedenen Volumina eingesetzt.

Bei optimal verlaufender Transfektion können nach ca. 5 Tagen erste Plaques beobachtet werden. Falls nach 7 Tagen keine Plaquebildung sichtbar war, wurde die Transfektion abgebrochen. Eine Übersicht der jeweiligen Virusrekonstitutionen ist in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Ergebnisse zur Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC-Technologie

mCMV-BAC-Plasmid	Transfiziertes Volumen BAC-Plasmid-DNA [µl DNA/Well]				Rekombinantes Virus
	5	10	15	20	
mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKL	++	++	+	+	mCMV-vRAP-SIINFEKL
mCMV-BAC-ΔvRAP-SIINFEKL	++	++	+	+	mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL
mCMV-BAC-vRAP-SIINFEKA	++	+	++	+	mCMV-vRAP-SIINFEKA
mCMV-BAC-ΔvRAP-SIINFEKA	+	++	++	+	mCMV-ΔvRAP-SIINFEKA

Plaque-Ausbeute 6 Tage nach Transfektion: + (bis zu 10 Plaques/Well), ++ (mehr als 10 Plaques/Well)

4.4.5 Exzision der BAC-Sequenzen

Nach der Virusrekonstitution ist es essentiell, die BAC-Sequenzen aus dem Virusgenom zu entfernen. Da alle verwendeten mCMV-BACs auf dem von Wagner et al., (1999) konstruierten C3X basieren, erfolgt die Exzision der BAC-Vektor-Sequenzen durch wiederholtes Passagieren auf C57BL/6 MEF. In den Zellen werden die die BAC-Vektor-Sequenz flankierenden Sequenz-Wiederholungen vom eukaryotischen Rekombinationssystem (Sugawara et al., 2000) erkannt und die BAC-Vektor-Sequenzen durch homologe Rekombination aus dem viralen Genom entfernt. Die nun auf ihre ursprüngliche Länge verkürzten mCMV-Genome werden während des *Packaging* bevorzugt in die viralen Kapside verpackt und reichern sich in der Folge an (Wagner et al., 1999).

Um eine ausreichende Zahl von Rekombinationsereignissen zu ermöglichen, wurden die rekonstituierten Viren fünfmal über MEF passagiert (siehe 3.2.4). Anschließend wurde die Exzision der BAC-Vektor-Sequenzen mittels quantitativer *Real-Time*-PCR überprüft (siehe 4.5). Bei Bestätigung erfolgreicher BAC-Sequenz-Exzision wurden die Viren aufge-

reinholt (siehe 3.2.1). Nach Bestimmung der Virustiter (siehe Tab. 12) erfolgte die Lagerung bei -80°C .

Tab. 12: Virustiter der generierten BAC-freien mCMV-Rekombinanten.

mCMV-Rekombinante	Virustiter (PFU/ml)
mCMV-vRAP-SIINFEKL	$2,95 \times 10^8$
mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL	$1,96 \times 10^8$
mCMV-vRAP-SIINFEKA	1×10^9
mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA	1×10^9

Die Virustiter der hochreinen Virusstocks wurden mittels Plaque-Assay bestimmt (siehe 3.2.2.1).

Zusammenfassung: Durch Transfektion von C57BL/6 MEF mit den generierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmiden konnten erfolgreich die in Tab. 12 aufgeführten mCMV-Rekombinanten generiert und aufgereinigt werden.

4.5 Etablierung einer quantitativen *Real-Time*-PCR zur Bestimmung von BAC-Sequenzen

Zur Quantifizierung von noch vorhandenen BAC-Vektor-Sequenzen rekonstituierter rekombinanter mCMV-Virionen wurde eine quantitative *Real-Time-PCR* (qPCR) etabliert. Mit dieser und einer *gB*-spezifischen qPCR (Simon et al., 2005) konnte das Verhältnis zwischen Gesamtgenomzahl und Genomen, die noch BAC-Vektor-Sequenzen beinhalten, erfasst werden.

4.5.1 Konstruktion eines Plasmid-Standards

Für eine absolute Quantifizierung von Sequenzabschnitten wird ein geeigneter Plasmid-Standard benötigt, dessen Titration den Vergleichsmaßstab liefert. Für die Klonierung eines BAC-Sequenz-Standards stand das Ausgangskonstrukt **pDrive_gB_PTHrP** (Simon et al., 2005) zur Verfügung, in das eine 1,2 kbp lange BAC-Vektor-Sequenz eingebracht wurde.

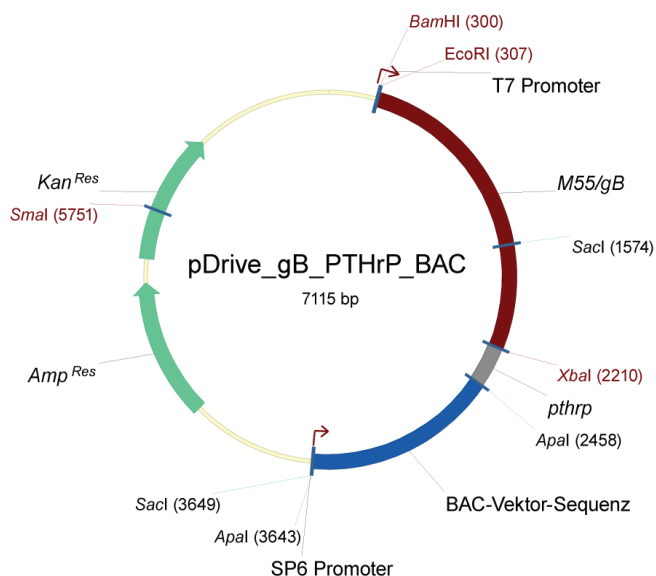


Abb. 19: Schematische Darstellung des Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_BAC

Karte des klonierten Plasmids pDrive_gB_PTHrP_BAC, das als Standard-Plasmid zur Quantifizierung der BAC-Sequenzen sowie zur Bestimmung der viralen DNA-Load (*M55/gB*) mittels qPCR eingesetzt wurde. Es umfasst ein Fragment des mCMV-Gens *M55/gB* (rot), das zelluläre Gen *pthrp* (*murine parathyroid hormone-related peptide-encoding gene*) (grau) sowie BAC-Vektor-Sequenzen (blau).

Zunächst wurde mittels PCR ein entsprechender Sequenz-Abschnitt aus dem mCMV-BAC-Plasmid C3X mit den Oligonukleotiden BAC_qPCR_Apa_for und BAC_qPCR_Apa_rev (*Annealing*: 51°C) amplifiziert. Das 1.186bp PCR-Produkt wurde mit *Apal* geschnitten und in den gleichfalls mit *Apal* restringierten und dephosphorylierten Vektor pDrive_gB_PTHrP ligiert (siehe 3.5.6 und 3.5.7), so dass der Vektor **pDrive_gB_PTHrP_BAC** (siehe Abb. 19) entstand. Nach Maxi-Präparation wurde der Vektor mit *SmaI* linearisiert, über ein Agarose-Gel aufgereinigt und anschließend seine Teilchenzahl bestimmt (siehe 3.5.11.4).

4.5.2 qPCR zur absoluten Quantifizierung von BAC-Sequenzen

Die absolute Quantifizierung der BAC-Sequenzen erfolgte über *TaqMan*-Sonden auf dem *TaqMan* (ABI PRISM® 7500) unter Verwendung des Primerpaars BAC_taq_for / BAC_taq_rev sowie der Sonde BAC_taq1. Dazu wurden log10-Titrations des zuvor mit *SmaI* linearisierten Standard-Plasmids pDrive_gB_PTHrP_BAC eingesetzt. Das optimierte PCR-Profil entspricht dem in 3.5.11.5 beschriebenen 2-Step-Protokoll.

Abb. 20 zeigt die Amplifikationsprofile und die korrespondierende Standardkurve der BAC-Sequenz sowie einer gB-spezifischen Sequenz (Oligonukleotid-Paar gB_Taq_For / gB_Taq_Rev, Sonde: gB_Taq) des Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_BAC. Die Berechnung der PCR-Amplifikationseffizienz (E) basiert auf der Formel $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Arezi

et al., 2003). Die errechnete Amplifikationseffizienz betrug auf dem *TaqMan* 7500 97% für die BAC-Vektor-Sequenz bzw. 98% für die gB-Sequenz. Dies bedeutet, dass in jedem PCR Zyklus annähernd eine Verdoppelung des Amplifikats erreicht werden konnte. Für den Vergleich zweier PCR-Reaktionen sollten die Amplifikationseffizienzen um maximal 5% divergieren. Da dies der Fall ist, lassen sich beide PCR-Reaktionen miteinander vergleichen und eignen sich zur Bestimmung der BAC-Sequenzen in Relation zur Gesamtzahl der Virus-Genome.

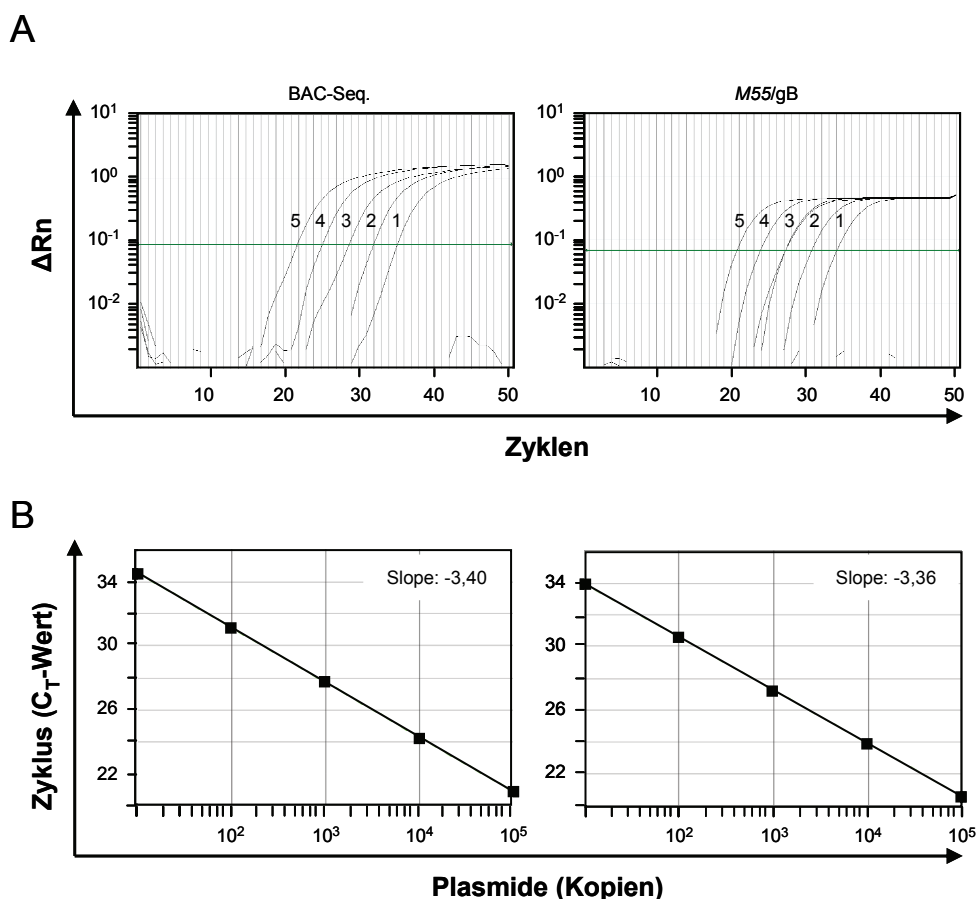


Abb. 20: Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen mit *TaqMan*-Sonden

A Amplifikationsprofile des mit *Sma*I linearisierten Plasmids pDrive_gB_PTHrP_BAC auf dem *TaqMan* 7500 für BAC-Vektor-Sequenz (links) und M55/gB (rechts) für eine Titration von 10^5 bis 10^1 Kopien. Die jeweilige Kopienzahl ist durch den Exponenten markiert. Auf der y-Achse ist die normalisierte relative Fluoreszenzintensität (R_n) aufgetragen, wobei die Fluoreszenz des Reporters durch die Fluoreszenz des passiven Referenzfarbstoffs (ROX) dividiert wird. Der ΔR_n -Wert bezeichnet die normalisierte relative Fluoreszenzintensität abzüglich des Hintergrunds (*Baseline*). Die horizontale Linie (grün) kennzeichnet den jeweiligen *Threshold*, der die korrespondierenden C_T -Werte definiert.

B Der Auftrag der jeweiligen C_T -Werte gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards führte zu den entsprechenden Standardkurven mit dem angegebenen *Slope*.

4.5.3 Quantifizierung von BAC-Sequenzen aus Überständen rekonstituierter mCMV-Rekombinanten

Nach Etablierung der qPCR für BAC-Sequenzen wurde diese dazu eingesetzt, die Exzision der BAC-Sequenzen in rekonstituierten Rekombinanten zu bestätigen. Dazu wurden zunächst Überstände der generierten Rekombinanten in der 5. Passage nach Rekonstitution aufgereinigt (siehe 3.5.10.2). Die gereinigte virale DNA diente als Template in der BAC-Sequenz-spezifischen qPCR. Gleichzeitig wurde auch die Zahl der viralen Genome mittels *gB*-spezifischer qPCR bestimmt. Beide PCRs wurden mit dem standardisierten Protokoll auf dem TaqMan 7500 durchgeführt (siehe 3.5.11.5). Als Standard diente eine \log_{10} Titration des linearisierten Plasmids pDrive_gB_PTHrP_BAC. Nach Bestimmung der Anzahl viraler Genome und BAC-Sequenzen konnte die Zahl der BAC-Sequenzen pro 1×10^7 Genome berechnet werden. Überstände mit weniger als 1×10^3 BAC-Sequenzen pro 1×10^7 Genome wurden als BAC-frei definiert und wurden aufgereinigt (siehe 3.2.1 und Tab. 12).

Die Ergebnisse der verschiedenen Rekonstitutionen sind in Tab. 13 zusammengefasst. Aus ihr ist ersichtlich, dass nach der 5. Passage für alle generierten Rekombinanten jeweils ein oder mehrere Überstände für eine Aufreinigung verwendbar waren. Zusätzlich ist deutlich erkennbar, dass auch nach 5 Passagen nicht alle Überstände BAC-frei (siehe Ü3 mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL) waren. Es ist daher notwendig für jede Virus-Rekonstitution die BAC-Freiheit zu überprüfen.

Tab. 13: Quantifizierung der BAC-Sequenz in Überständen rekonstituierter mCMV-Rekombinanten

mCMV-Rekombinante	BAC-Sequenz			Genome (gB/M55)			BAC-Sequenzen pro 1×10^7 Genome		
	Ü1	Ü2	Ü3	Ü1	Ü2	Ü3	Ü1	Ü2	Ü3
mCMV-vRAP-SIINFEKL	$2,4 \times 10^2$	3×10^2	3×10^4	$2,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$9,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$
mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL	$6,7 \times 10^2$	4×10^5	$2,9 \times 10^2$	$7,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$8,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$
mCMV-vRAP-SIINFEKA	$7,9 \times 10^1$	$4,8 \times 10^1$	5×10^2	$2,1 \times 10^7$	2×10^7	$1,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^1$	$2,4 \times 10^1$	$2,9 \times 10^2$
mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA	$1,6 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$2,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	2×10^7	$2,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^{-1}$	$7,5 \times 10^0$	$1,3 \times 10^5$

Exemplarische Auswahl von quantifizierten Überständen der generierten Rekombinanten. Die Virus-DNA der Klon wurde entsprechend 3.5.10.2 aufgereinigt und 1 μ l als Template in der qPCR eingesetzt. Die grau hinterlegten Klone wurden für die anschließende Virus-Aufreinigung ausgewählt.

Zusammenfassung: Die erfolgreiche Klonierung eines Plasmid-Standards ermöglichte die Etablierung einer qPCR zur absoluten Quantifizierung von BAC-Vektor-Sequenzen. Mit Hilfe der qPCR konnte die erfolgreiche Exzision der BAC-Sequenzen aus mCMV-BAC-Plasmiden nach homologer Rekombination in MEF nachgewiesen werden.

4.5.4 Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses

Eine wesentliche Vergleichsgröße zwischen mCMV-WT und rekombinanten mCMVs ist das Genom-zu-PFU-Verhältnis. Dieses Verhältnis gibt die Anzahl der Genome an, die zur Bildung eines Plaque auf MEF in der Zellkultur benötigt werden und damit einer PFU entsprechen. Gleichzeitig ist es auch ein Maß für die Infektiosität der Rekombinanten, da die Plaque-Bildung über mehrere Infektionsrunden hinweg erfolgt. Als Vergleichswert für eine unbeeinflusste Replikation kann hierbei das von Kurz et al. (1997) für mCMV-WT (*Strain* Smith) beschriebene Genom-zu-PFU-Verhältnis von ~500 zu 1 dienen.

Die Quantifizierung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses erfolgte mit der von Simon et al. (2005) etablierten qPCR zur Bestimmung des viralen Gens *M55/gB* (Oligonukleotid-Paar gB_Taq_For / gB_Taq_Rev, Sonde: gB_Taq). Dazu wurden virale Genome, die einer definierten PFU-Zahl entsprechen, aufgereinigt und in log₁₀-Stufen titriert. Im Anschluss daran wurde die Zahl der viralen Genome in jeder Verdünnungsstufe in Triplikaten bestimmt. Als externer Standard diente das mit *Sma*I linearisierte Plasmid pDrive_gB_PTHrP_Tdy (Simon et al., 2005). Die für die generierten Rekombinanten ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse sind in Tab. 14 im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangsviren (mCMV-vRAP und mCMV-ΔvRAP) und zum mCMV *Strain* Smith dargestellt. Wie aus der Tabelle hervorgeht unterscheiden sich die Rekombinanten nur gering vom Literaturwert von 500:1 (Kurz et al., 1997).

Tab. 14: Bestimmung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse der generierten mCMV-Rekombinanten

mCMV-Rekombinante	Virustiter (PFU/ml)	Genome pro PFU (Triplikate)	Genome pro PFU (Mittelwerte)
mCMV (<i>Strain</i> Smith)	$1,13 \times 10^9$	294; 327; 213	278
mCMV-vRAP	$1,34 \times 10^8$	262; 217; 163	214
mCMV-ΔvRAP	$1,5 \times 10^8$	331; 417; 390	379
mCMV-vRAP-SIINFEKL	$2,95 \times 10^8$	581; 437; 441	486
mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL	$1,96 \times 10^8$	503; 461; 415	460
mCMV-vRAP-SIINFEKA	$1,00 \times 10^9$	482; 469; 367	439
mCMV-ΔvRAP-SIINFEKA	$1,07 \times 10^9$	100; 114; 149	121

Die einer definierten PFU-Zahl entsprechende Virion-DNA wurde unabhängig in Triplikaten aufgereinigt, jeweils titriert (5 log₁₀-Stufen) und in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt. Dabei diente das linearisierte Plasmid pDrive_gB_PTHrP_Tdy als Standard. Die berechneten Werte der viralen Genome pro PFU sind gemittelt aufgeführt. Zum Vergleich sind auch die Werte der Ausgangsviren, sowie von mCMV (*Strain* Smith) bestimmt worden.

Zusammenfassung: Die Bestimmung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse der generierten mCMV-Rekombinanten zeigte, dass sich ihre *in vitro*-Infektiosität im Vergleich zu mCMV (*Strain* Smith) durch den orthotopen Peptidaustausch nicht wesentlich verändert hat.

4.6 Charakterisierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der orthotope Peptidaustausch innerhalb des Proteins m164/gp36,5 zu keiner veränderten *in vitro* Infektiosität führte. Daraus kann allerdings nicht geschlossen werden, dass das Trägerprotein m164/gp36,5 weiterhin funktionell exprimiert wird, da es weder *in vitro* (Thäle et al., 1995) noch *in vivo* (Däubner, 2007; J. Müller, Diplomarbeit) essentiell für die mCMV-Replikation ist. Auch konnte dem Protein m164/gp36,5 bisher noch keine Funktion zuzuordnet werden, so dass es nur möglich ist, Expression und intrazelluläre Lokalisation zu überprüfen und daraus Rückschlüsse auf ein unverändertes Protein zu ziehen. Neben der basalen Charakterisierung war es notwendig, auch den Einfluss des orthotopen Austausches auf die *in vivo* Infektiosität zu untersuchen.

4.6.1 Expressionskinetik des Proteins m164/gp36,5-SIINFEKL

Zum Nachweis des Proteins m164/gp36,5 steht ein polyklonaler Antikörper zu Verfügung (Holtappels et al., 2008), der ein C-terminales Epitop erkennt und dieses sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz nachweist.

Zunächst sollte die zeitliche Kinetik der Expression des veränderten Proteins m164/gp36,5-SIINFEKL im Vergleich zu m164/gp36,5 untersucht werden. Dazu wurden MEF mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV-vRAP zentrifugal infiziert (MOI 4), die Zellen zu definierten Zeitpunkten geerntet und Zell-Lysate gewonnen (siehe 3.4). Nach Auftrennung der Lysate in der SDS-PAGE und anschließendem Blot wurde m164/gp36,5 mit dem polyklonalen α -m164 Antikörper gefärbt. Der Nachweis gelang in beiden Gruppen nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in der ECL-Reaktion.

Der Western Blot in Abb. 21 zeigt deutlich, dass in der Expression beider Proteine kein Unterschied erkennbar ist. In beiden Infektionen konnte m164/gp36,5 ab 3h p.i. nachgewiesen werden, auch die Banden-Intensität zwischen beiden war zu den entsprechenden Zeitpunkten vergleichbar. Da keine Veränderung der Größe des detektierten m164/gp36,5 zu erkennen ist, kann auch eine vergleichbare post-translationale Proteinreifung angenommen werden.

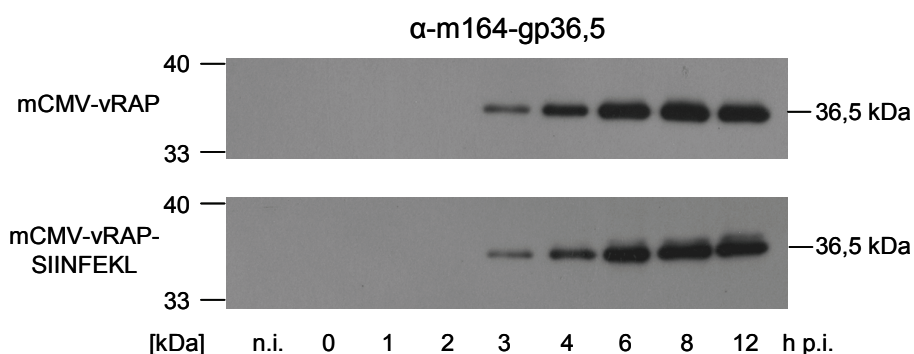


Abb. 21: Kinetik der Expression von m164/gp36,5

Western Blot von Gesamtzell-Lysaten aus mit mCMV-vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL infizierten MEF zu verschiedenen Zeitpunkten p.i.. Die Auftrennung von 30 μ g Gesamtprotein je Spur erfolgte in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel, der anschließende Blot auf einer PVDF-Membran. Das Protein m164/gp36,5 wurde mit einem polyklonalen α -m164 Antikörper nach ECL-Entwicklung nachgewiesen.

4.6.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse der intrazellulären m164/gp36,5-Expression

Eine weitere Kontrolle der unbeeinflussten Expression von m164/gp36,5 ist ein Vergleich der intrazellulären Lokalisation in der Immunfluoreszenz. Dazu wurden MEF mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV-vRAP infiziert (zentrifugal, MOI 4) und 6h p.i. fixiert. Das Protein m164/gp36,5 wurde mit dem polyklonalen α -m164 Antikörper und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Darstellung erfolgte mit einem *Laser Scanning-Mikroskop*.

Deutlich ist in Abb. 22 erkennbar, dass m164/gp36,5 sowohl nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL als auch mit mCMV-vRAP in seiner typischen Lokalisation dargestellt werden konnte. Das Protein ist als rote Fluoreszenz im Kernrandbereich und in einem zytoplasmatischen Netzwerk, das als ER identifiziert wurde, nachweisbar (Däubner, 2007). Es konnte somit gezeigt werden, dass der orthotope Peptidaustausch keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation hat.

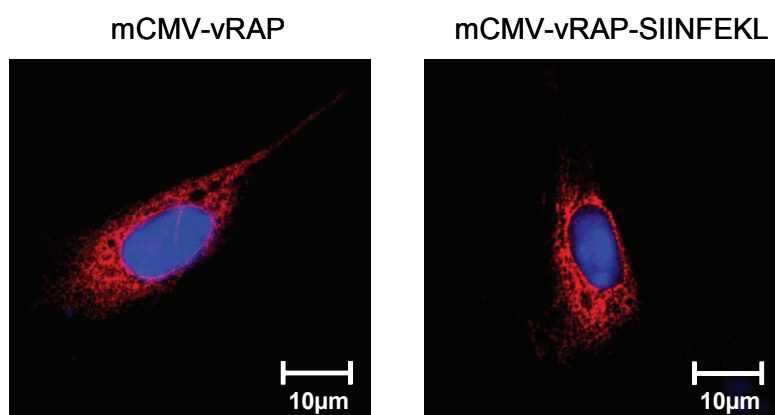


Abb. 22: Lokalisation des m164-Proteins in infizierten MEF

MEF wurden mit mCMV-vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL infiziert und 6h p.i. mit PFA fixiert. Die Detektion von m164/gp36,5 erfolgte in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem α -m164 Antikörper sowie einem Alexa Fluor 546 konjugierten Sekundärantikörper (Ziege- α -Kaninchen). Das Fluorophor wurde mit einem Argonlaser ($\lambda=546\text{nm}$) angeregt und im konfokalen Laser Scanning-Mikroskop detektiert. Deutlich erkennbar ist die Lokalisierung von m164/gp36,5 (rot) in einem zytoplasmatischen Netzwerk sowie im Kernrandbereich. Die Darstellung des Zellkerns (blau) erfolgte durch Färbung der DNA mit Hoechst 33342.

Zusammenfassung: Die Expressionskinetik und die intrazelluläre Lokalisation des Trägerproteins m164/gp36,5 wurden durch den orthotopen Peptidaustausch nicht verändert. Das m164/gp36,5-SIINFEKL war weiterhin ab 3h p.i. im ER nachweisbar.

4.6.3 *In vivo* Charakterisierung von mCMV-Rekombinanten

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass sich der orthotope Peptidaustausch weder auf die *in vitro* Infektiosität des Virus noch auf Expression und Lokalisation des Proteins m164/gp36,5 auswirkt. Es war aber noch notwendig zu zeigen, dass sich die Mutation nicht auf die sogenannte „replikative Fitness“, d.h. die *in vivo* Replikation, auswirkt. Es sollte deshalb in der Maus untersucht werden ob es nach Infektion zu einer Attenuierung oder Verstärkung der Virulenz durch den orthotopen Peptidaustausch kommt.

Die mCMV-Infektion wird im immunkompetenten Tier effektiv vom Immunsystem kontrolliert, weshalb die *in vivo* Replikation im immundepletierten Tier zu verfolgen ist. Das eingebrachte Peptid SIINFEKL wird nur in Mäusen des MHC-Haplotyps H-2^b präsentiert, so dass für die Replikations-Kinetik 8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse nach γ -Bestrahlung (7,5Gy) intraplanar mit 1×10^5 PFU mCMV-vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL infiziert und an definierten Zeitpunkten Milz, Lunge und Leber entnommen wurden. Da bekannt ist, dass in C57BL/6 Mäusen trotz Bestrahlung NK-Zellen infizierte Zellen erkennen und eliminieren, sind deutlich niedrigere Virustiter als in BALB/c Mäusen zu erwarten (Holtapels et al., 2004).

Es gilt als hinreichend gesichert, dass der individuelle Virustiter einzelner Tiere erheblich schwanken kann, selbst wenn Alter und Geschlecht identisch sind. Speziell nach hämatoablativer Behandlung durch γ -Bestrahlung können die Organtiter, begründet durch stochastische Genotoxizität der Bestrahlung, um einen Faktor 10^1 bis 10^2 variieren (Reddihase et al., 1985). Dieses stochastische Ereignis moduliert damit die Depletion der zellulären Immunantwort jedes Individuums unterschiedlich und erklärt die beobachteten Varianzen zwischen den Virustitern. Um trotzdem eine Analyse zu gewährleisten, wurden Gruppengrößen von mindestens drei Tieren je Zeitpunkt und Virus analysiert.

Schon Podlech et al. (1998) haben gezeigt, dass die Infektion mit mCMV polytrop ist, d. h., dass verschiedene Zelltypen zur produktiven Infektion beitragen und sich somit unter Immunsuppression eine Multiorganerkrankung manifestieren kann. In dieser Arbeit wurde die Replikation in einer Auswahl von Organen (Milz, Lunge) mit dem Plaque-Assay (siehe 4.6.3.1) *in vitro* und einer IE1-spezifischen Immunohistochemie (Leber) *in situ* analysiert (siehe 4.6.3.2).

4.6.3.1 Vergleich der Virusreplikation in Milz und Lunge durch Plaque-Assay

Der Plaque-Assay ist ein klassischer *in vitro* Nachweis für infektiöse Partikel. Diese werden über den zytopathischen Effekt (Lyse) infizierter, permissiver Zellen nachgewiesen. Dabei kann die Infektiosität bzw. der Titer aus Zellkulturüberständen, Blut, oder wie hier aus Organhomogenaten bestimmt werden. Durch den Vergleich der viralen Organtiter von Tieren, die mit mCMV-WT bzw. einer entsprechenden mCMV-Rekombinanten infiziert sind, lassen sich Rückschlüsse auf eine mögliche Attenuierung ziehen.

Um zu überprüfen, ob der orthotope Peptidaustausch einen Einfluss auf die *in vivo* Replikation hat, wurden immundepletierte C57BL/6-Mäuse mit mCMV-vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL intraplanter infiziert. An den Tagen 4, 6, 8 und 10 p.i. wurden die Milzen und Lungen von jeweils 4 Tieren je Gruppe entnommen und die Organe homogenisiert. Die Organtiter wurden dann nach \log_{10} -Titration der Homogenate im Plaque-Assay bestimmt. Das Ergebnis der *in vivo*-Replikationskinetik ist in Abb. 23 zusammengefasst.

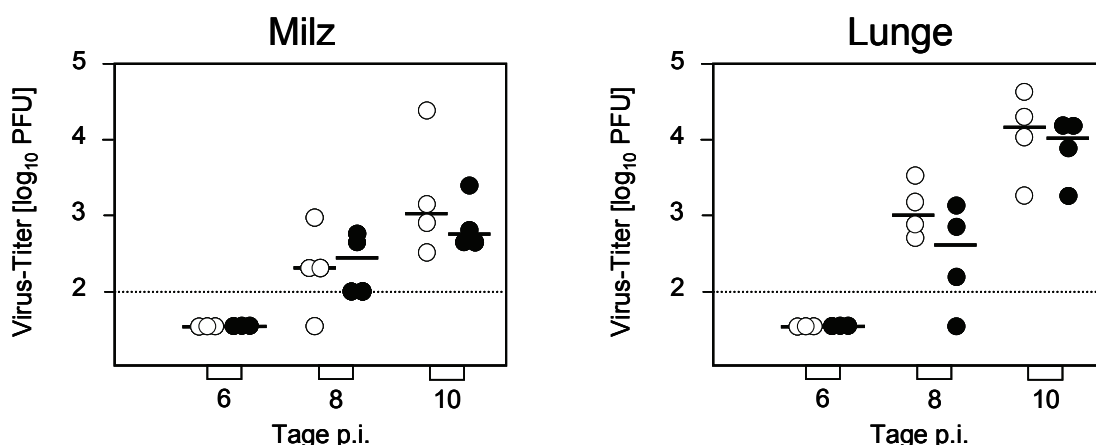


Abb. 23: *In vivo* Replikation von mCMV-vRAP-SIINFEKL im Vergleich zu mCMV-vRAP

Zu den Zeitpunkten 6, 8 und 10 Tagen p.i. wurden Milz und Lunge von je 4 mit mCMV-vRAP (○) oder mCMV-vRAP-SIINFEKL (●) infizierten C57BL/6-Mäusen entnommen. Anschließend wurden die entsprechenden Organtiter im Plaque-Assay bestimmt. Die Nachweisgrenze der Assays lag bei 1×10^2 PFU pro Organ (gepunktete Linie). Die Mediane der Werte sind durch schwarze horizontale Balken markiert.

Bis Tag 6 p.i. waren weder in der Milz noch in der Lunge infektiöse Partikel nachweisbar. Erst zu späteren Zeitpunkten konnte eine Plaquebildung beobachtet werden. Dabei erreichten beide Viren zu den entsprechenden Zeitpunkten vergleichbare Organtiter. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der orthotope Peptidaustausch nicht zur Attenuierung der generierten Rekombinanten führte.

4.6.3.2 Nachweis der Virusreplikation in der Leber durch IE1-spezifische Immunhistologie

Neben der Quantifizierung der Virusreplikation in Lunge und Milz wurde in denselben Individuen auch die mCMV-Replikation histologisch in der Leber verfolgt. Die dabei verwendete immunhistologische Färbung des viralen IE1-Proteins (pp76/89) zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität aus. Außerdem lassen sich infizierte Zellen in jedem Stadium des viralen Replikationszyklus nachweisen, da das IE1-Protein schon kurz nach der Infektion in großen Mengen synthetisiert und in den Nukleus transportiert wird, wo es während der gesamten Replikation verbleibt und in der späten Phase der Infektion an der Bildung eines intranukleären Einschlusskörpers beteiligt ist.

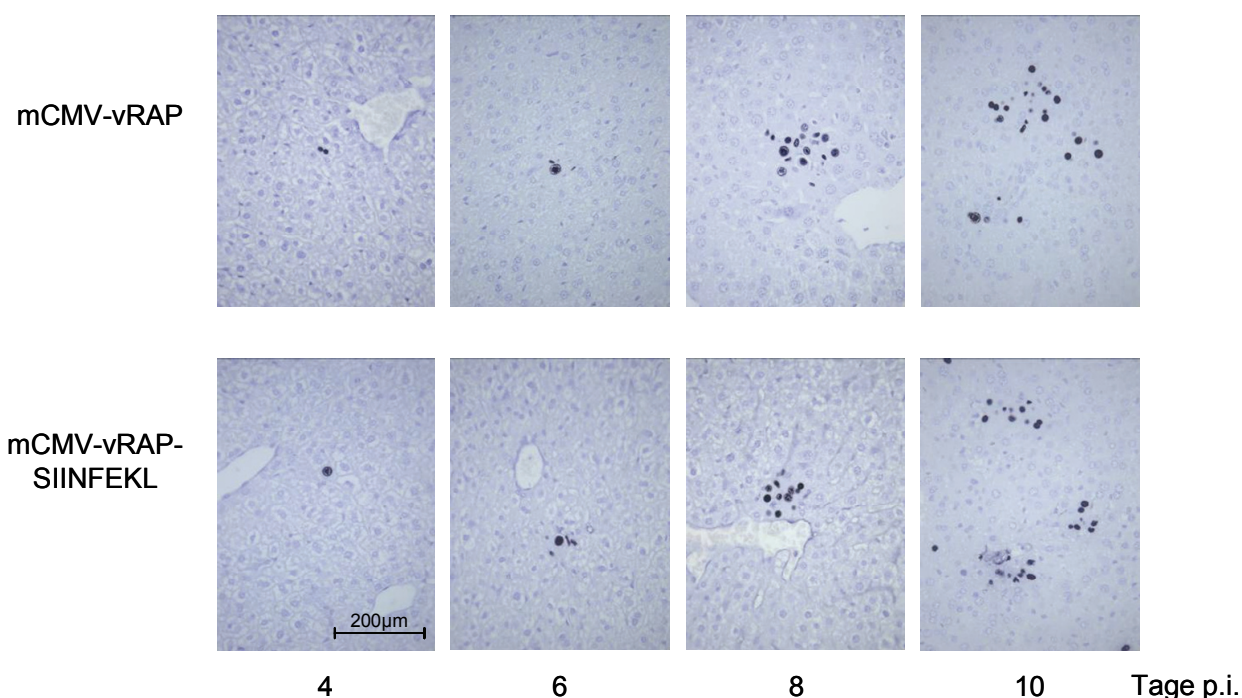


Abb. 24: Immunhistologischer Nachweis der *in vivo*-Replikation der mCMV-vRAP-SIINFEKL-Rekombinanten im Vergleich zu mCMV-vRAP

Der Nachweis von intranukleärem pp89 (IE1) in infizierten Leberzellen erfolgte immunohistochemisch nach Färbung mit dem mAb Croma 101. Gezeigt werden pp76/pp89 positive Zellkerne (schwarz) an Tag 4, 6, 8 und 10 p.i. für die jeweiligen Viren. Gegenfärbung Hämalaun.

Das Ergebnis der IHC-Untersuchung ist in Abb.24 exemplarisch für je eine Leber nach Infektion mit mCMV-vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL für die Tage 4, 6, 8 und 10 p.i. dargestellt. Einzelne IE1-positive Zellen waren bei beiden Gruppen ab Tag 4 nachweisbar. Im weiteren Verlauf war deutliche die Zunahme der Zahl infizierter Hepatozyten und die Bildung neuer *Foci* der Infektion deutlich zu erkennen. Der Vergleich beider Viren zeigte jedoch keinen qualitativen Unterschied in der viralen Replikation. Für die quantitative Bestätigung dieser Befunde wurde die Anzahl der IE1-positiven Zellen in einem re-

präsentativen Bereich von 10mm² pro Leberschnitt für die Tage 4, 6, 8 und 10 p.i. ermittelt (siehe Abb. 25).

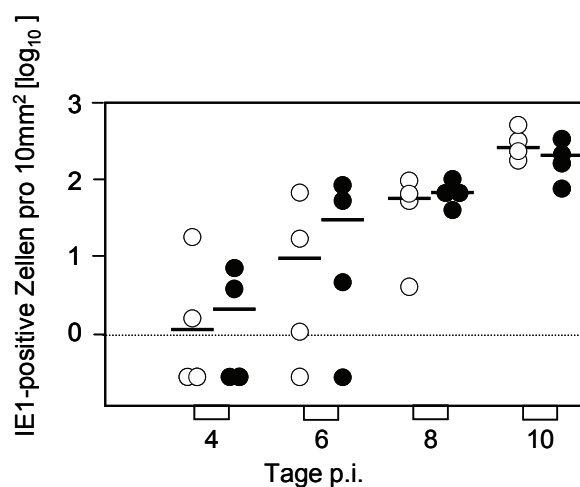


Abb. 25: Kinetik der *in vivo*-Replikation von mCMV-vRAP-SIINFEKL im Vergleich zu mCMV-vRAP

Zu den Zeitpunkten 4, 6, 8 und 10 Tage p.i. wurden die Lebern von je 4 mit mCMV-vRAP (○) oder mCMV-vRAP-SIINFEKL (●) infizierten immunsupprimierten C57BL/6 Mäusen entnommen. Die Anzahl der IE1-positiven Zellen wurde immunhistologisch jeweils für eine repräsentative Fläche von 10mm² ermittelt. Die Nachweisgrenze (gepunktete Linie) des Assay liegt bei einer IE1-positiven Zelle im entsprechenden Leberschnitt. Die Mediane sind durch schwarze horizontale Balken markiert.

Zusammenfassung: In der vergleichenden Infektion von mCMV-vRAP und mCMV-vRAP-SIINFEKL konnte gezeigt werden, dass unter immunsuppressiven Bedingungen die Insertion von SIINFEKL die *in vivo*-Replikation in Lunge, Milz und Leber nicht verändert.

4.7 Immunologische Charakterisierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten

4.7.1 Nachweis der Immunogenität der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten

Wie die Sequenzierung der mCMV-Rekombinanten gezeigt hat (siehe 4.4.3.2), war in den Viren mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL der orthotope Peptidaustausch erfolgreich. Die weiteren Untersuchungen ergaben, dass die Mutagenese keinen Einfluss auf das Trägerprotein m164/gp36,5 und die *in vitro* bzw. *in vivo* Infektiosität hat. Somit konnte in den nun folgenden Experimenten die *in vivo* und *in vitro* Antigenität des integrierten SIINFEKL-Peptids überprüft werden.

Unter der Voraussetzung, dass SIINFEKL vergleichbar einem viralen Peptid prozessiert und präsentiert wird, sollte die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit den generierten Viren zu einem SIINFEKL-spezifischen *Priming* von CD8 T-Zellen führen.

4.7.1.1 *Priming* von mCMV-Peptid-spezifischen T-Zellen

Nach Infektion mit den SIINFEKL-kodierenden mCMV-Mutanten sollte das orthotop integrierte Peptid SIINFEKL nach proteasomaler Prozessierung und Präsentation über das MHC-Klasse-I K^b-Molekül CD8 T-Zellen aktivieren. Für den Nachweis eines erfolgreichen *Primings* wurden immunkompetente C57BL/6 Mäuse intraplanar mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL infiziert. Am Tag 8 p.i. erfolgte die immunomagnetische Isolierung und Anreicherung von CD8 T-Zellen aus der Milz (siehe 3.6.2) und die Bestimmung der Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen im IFN γ *ELISpot*-Assay.

Als APCs dienten in diesem Assay mit titriertem (10^{-6} M- 10^{-11} M) synthetischem SIINFEKL-Peptid beladene EL-4 Zellen. Das ebenfalls über MHC-Klasse-I K^b-Moleküle präsentierte, immundominante mCMV Peptid m139₄₁₉₋₄₂₆ diente als Kontrolle des mCMV-spezifischen *Primings*. Die in Abb. 26 dargestellten Ergebnisse des *ELISpot*-Assay zeigten, dass am Tag 8 p.i. SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nachweisbar waren. Zudem war das SIINFEKL-spezifische *Priming* für beide Infektionen vergleichbar stark. Die gemessene Frequenz von 0,4-0,5% aller CD8 T-Zellen lag dabei niedriger als die des immundominanten, viralen m139-Peptids. Auffällig war, dass eine Expression der vRAPs das Peptid-spezifische *Priming* leicht verbessert und nicht verschlechtert. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird bei Böhm et al. (2008) diskutiert.

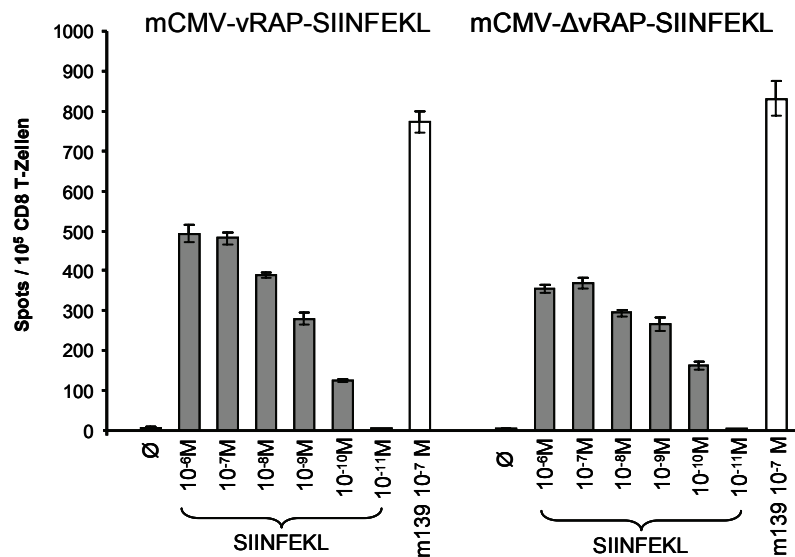


Abb. 26: Funktionelle Verifizierung der SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten

Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden intraplantar entweder mit mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mit mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL infiziert. Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen der Milz wurde in einem IFN γ ELISpot-Assay 8 Tage p.i. bestimmt. Dazu wurden die CD8 T-Zellen immunomagnetisch aufgereinigt. Die Stimulation erfolgte spezifisch durch mit synthetischen Peptiden (10^{-6} - 10^{-11} M SIINFEKL; 10^{-7} M m139) beladene APCs. Zur Kontrolle wurden unbeladene (Ø) EL-4 Zellen eingesetzt. Die Balken repräsentieren die MPNs bestimmt durch lineare Regressionsanalyse der Effektorzell-Titrations unter Verwendung von Mathematica V6.0 Statistik-Software ("Linear Regression"; Wolfram Research Inc.). Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall dar, P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$. MPN: *Most Probable Number*

4.7.1.2 Einordnung der SIINFEKL-Spezifität in das *Priming* Profil der mCMV-Infektion

Die Infektion mit mCMV induziert in der Maus ein bestimmtes Frequenzmuster der CD8 T Zell-Spezifitäten, das abhängig ist vom MHC-Haplotyp des infizierten Maus-Stammes sowie vom Zeitpunkt der Analyse. Für die mCMV-Infektion von C57BL/6-Mäusen konnten Munks et al. (2006a; b; 2007) eine ganze Reihe von T-Zell-Spezifitäten nachweisen und deren Frequenzveränderung über den Verlauf der Infektion verfolgen.

Wie in Abschnitt 4.7.1.1 gezeigt werden konnte, primen die generierten Rekombinanten erfolgreich SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen. Damit stellte sich die Frage, wie sich die neue Spezifität in das Muster der mCMV-spezifischen CD8 T-Zellen des Haplotyps H-2^b einordnet und wie sich daraufhin die zeitliche Entwicklung des CD8 T Zell-Repertoires darstellt.

Um dieses zu analysieren wurden zunächst 8 Wochen alte immunkompetente C57BL/6-Mäuse mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV-vRAP infiziert und an definierten Zeitpunkten während der Akut- und *Memory*-Phase der Infektion die Frequenzen der CD8-Spezifitäten bestimmt. Hierfür wurden aus einem Pool von je 3 Milzen die CD8 T-Zellen

immunomagnetisch aufgereinigt und im Anschluss als Effektorzellen in einen IFN γ *ELISpot*-Assay eingesetzt. Durch Stimulation mit Peptid-beladenen APCs (siehe 2.1.7) konnten die verschiedenen CD8 T Zell-Spezifitäten abgefragt werden. Hierfür wurde eine Auswahl von Peptiden eingesetzt, die sich an den von Munks et al. (2006a; b) beschriebenen Peptiden des Haplotyps H-2^b orientierten und sowohl MHC-K^b restringierte (M38₃₁₆₋₃₂₃, M57₈₁₆₋₈₂₄, m139₄₁₉₋₄₂₆, m164₁₆₀₋₁₆₈) als auch MHC-D^b restringierte (M45₉₈₅₋₉₉₃, M122/IE3₄₁₆₋₄₂₃) umfassten.

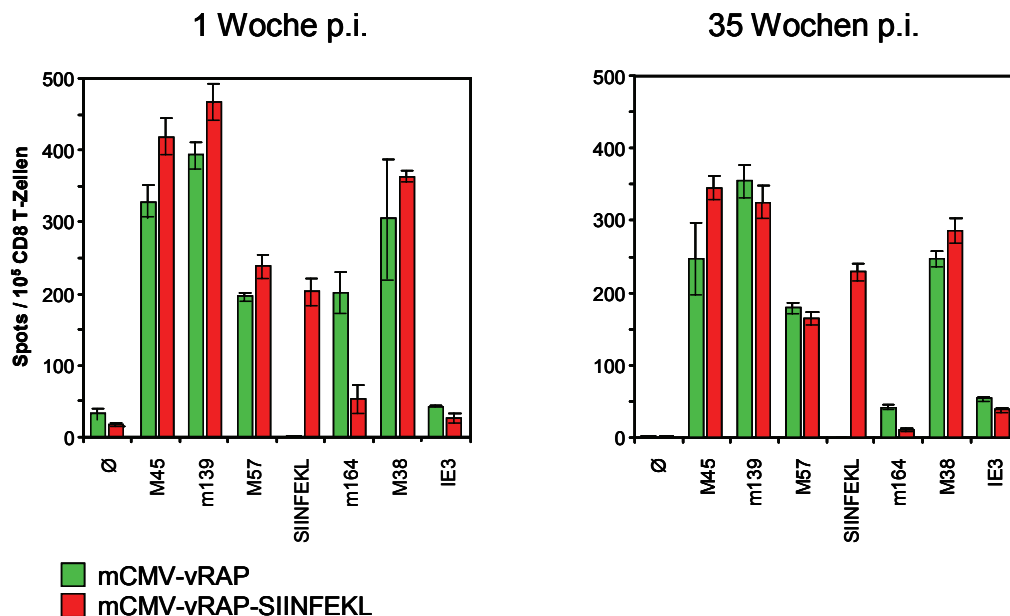


Abb. 27: Vergleich des CD8 T Zell-Repertoires in der Akut- und Memory-Phase der Infektion

Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen der Milz wurde in einem IFN γ *ELISpot*-Assay 1 bzw. 35 Wochen p.i. bestimmt. Dazu wurden die T-Zellen immunomagnetisch aufgereinigt. Die Stimulation erfolgte spezifisch durch mit den entsprechenden synthetischen Peptiden (10^{-7} M) beladene EL-4 Zellen. Zur Kontrolle wurden unbeladene (Ø) APCs eingesetzt. Die Balken repräsentieren die MPNs bestimmt durch lineare Regressionsanalyse der Effektorzell-Titrations unter Verwendung von Mathematica V6.0 Statistik-Software ("Linear Regression"; Wolfram Research Inc.). Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall dar, P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung <0,001.

Die in Abb. 27 dargestellte Verteilung des CD8 T Zell-Repertoires zeigt, wie sich SIINFEKL in das bestehende Spektrum der von mCMV induzierten T-Zell-Antwort eingliedert. Es erreichte dabei nicht die Immundominanz der Peptide M45₉₈₅₋₉₉₃ und m139₄₁₉₋₄₂₆, sondern eher eine mit M57₈₁₆₋₈₂₄ vergleichbare Frequenz. Trotz Schwankungen zeigten die CD8 T Zell-Spezifitäten nach Infektion mit mCMV-vRAP und mCMV-vRAP-SIINFEKL eine ähnliche Verteilung. Die auffälligste Veränderung war für das D^b präsentierte Peptid (m164₁₆₀₋₁₆₈), das nur 2 Aminosäurepositionen hinter dem Integrationsort von SIINFEKL beginnt, zu beobachten. Für dieses m164-Peptid waren die Frequenzen der CD8 T-Zellen während der akuten Infektion bei Anwesenheit von SIINFEKL deutlich reduziert.

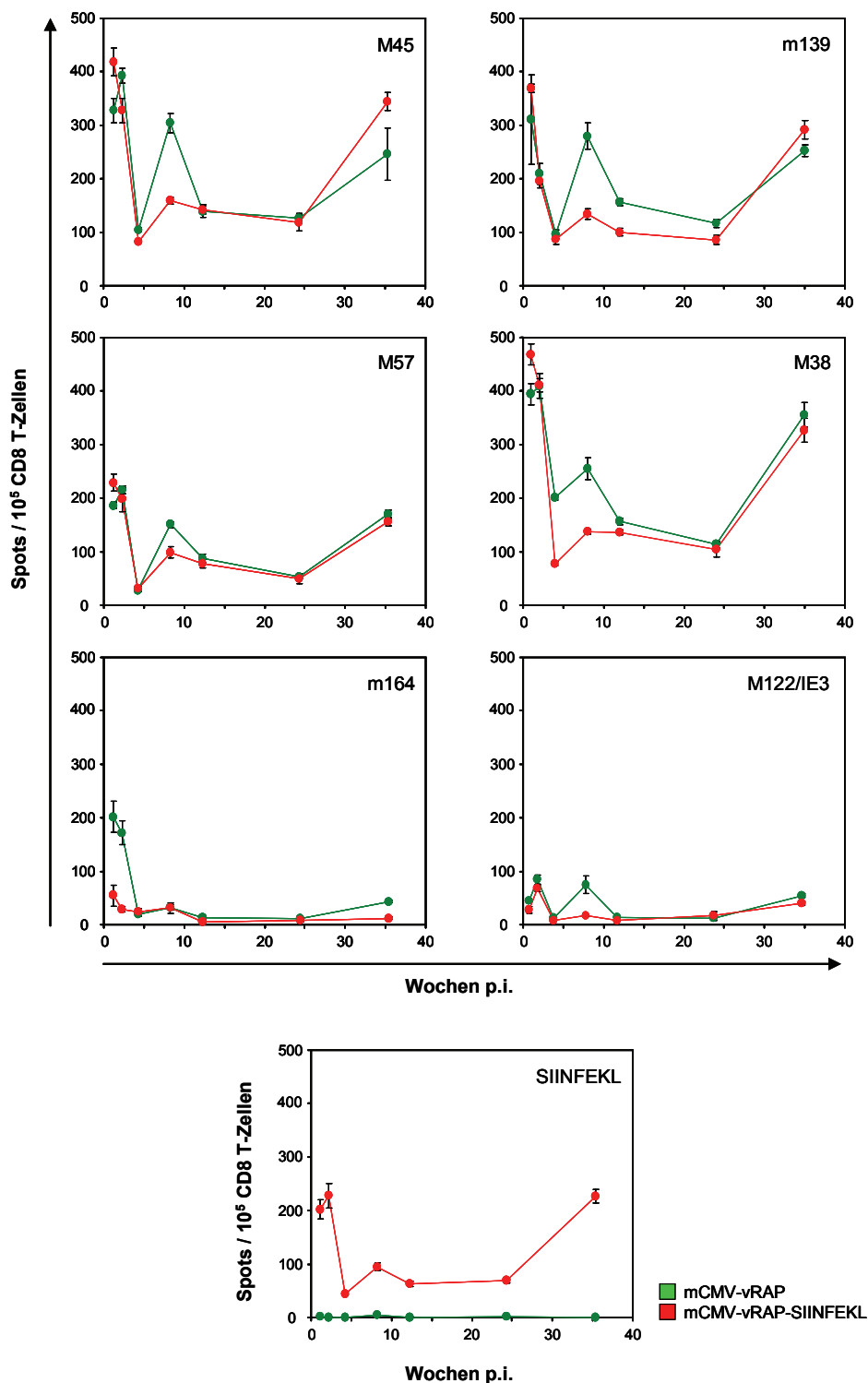


Abb. 28: Kinetik des SIINFEKL-spezifischen *Primings*

Immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden intraplanar mit 1×10^5 PFU mCMV-vRAP-SIINFEKL (rot) bzw. mCMV-vRAP (grün) infiziert. Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen der Milz wurde in einem IFN γ *ELISpot*-Assay 1, 2, 4, 8, 12, 24 und 35 Wochen p.i. bestimmt. Die immunomagnetisch aufgereinigten CD8 T-Zellen wurden spezifisch durch APC, die mit 10^{-7} M synthetischem Peptid beladen waren, stimuliert. Die Punkte repräsentieren die MPNs bestimmt durch lineare Regressionsanalyse der Effektorzell-Titrations unter Verwendung von Mathematica V6.0 Statistik-Software ("Linear Regression"; Wolfram Research Inc.). Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall dar, P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$.

Auffällig war, dass 8 Wochen p.i. die von mCMV-vRAP induzierten CD8 T Zell-Frequenzen signifikant höher waren als nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL (siehe Abb. 28). Dennoch ließ sich feststellen, dass die SIINFEKL-Integration nicht zu großen Veränderungen der induzierten T-Zell-Antwort führte.

Zusammenfassung: Nach Infektion von C57BL/6-Mäusen mit mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL konnten SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Expression der vRAPs keinen Einfluss auf die Frequenzen der CD8 T-Zellen. Während der Akut- sowie der *Memory*-Phase ordnet sich die Frequenz der SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen in die Frequenzen der mCMV-Spezifitäten ein.

4.7.2 Generierung und Charakterisierung einer SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Linie

Die bisher dargestellten Daten zeigten, dass nach Infektion mit SIINFEKL-kodierenden mCMV-Rekombinanten SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen *in vivo* geprimt wurden. Diese SIINFEKL-spezifischen T-Zellen sollten nun *in vitro* näher charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst polyklonale, SIINFEKL- oder m139- spezifische T-Zelllinien (CTLL) angelegt (siehe 3.6.3). Die dafür benötigten *Memory*-CD8 T-Zellen wurden aus Milzen von 10 mit mCMV-vRAP-SIINFEKL infizierten C57BL/6-Mäusen 6 Monate p.i. präpariert. Die Zellen wurden anschließend mit 10^{-9} M bzw. 10^{-10} M antigenem Peptid inkubiert und nach dem in 3.6.3 beschriebenen Vorgehen dreimal restimuliert.

Mit Hilfe der synthetischen Peptide SIINFEKL- bzw. m139₄₁₉₋₄₂₆ wurden insgesamt 4 CTLL generiert, die eine Woche nach der 3. Restimulation auf ihre Sensitivität im Zytolyse-Assay untersucht wurden (siehe Abb. 29).

Die generierten CTLL zeigten vergleichbare lytische Aktivität, die bei dem verwendeten Effektor zu Target Verhältnis von 1:15 bei max. 60% lag. Bei Vergleich der halbmaximalen Lysen ist zu erkennen, dass die SIINFEKL-CTLL eine um den Faktor 10 höhere Sensitivität hatte als die m139-CTLL. Sie lag bei den SIINFEKL-CTLL zwischen 10^{-11} M und 10^{-12} M, bei der m139-CTLL zwischen 10^{-10} M und 10^{-11} M.

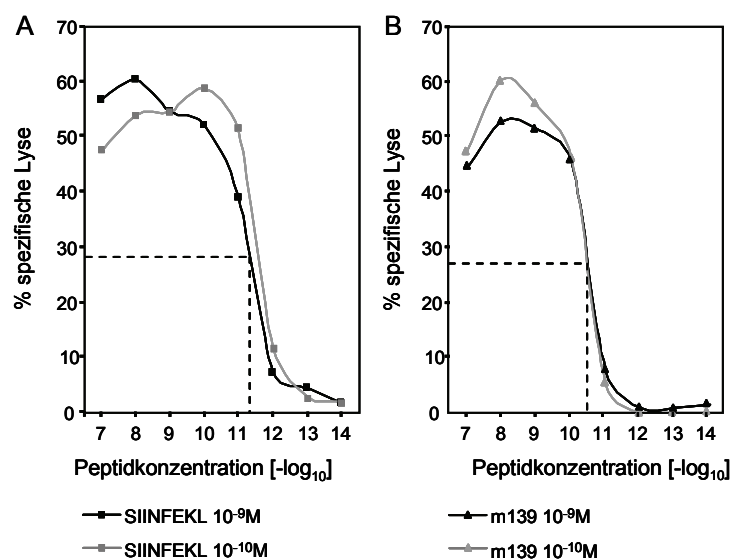


Abb. 29: Zytolytische Aktivität SIINFEKL- und m139-spezifischer CD8 T-Zellen

Mit titrierten Peptiden (10^{-7} M bis 10^{-14} M) beladene EL-4 Zellen dienten als APC in einem 4h Zytolyse-Assay. Als Effektor Zellen wurden polyklonale CTLL nach der 3. Restimulation in einem Effektor zu Target Verhältnis (E:T) von 15:1 eingesetzt. Die getesteten Linien waren aus mit mCMV-vRAP-SIINFEKL infizierten C57BL/6-Mäusen durch Restimulation von Memory CD8 T-Zellen mit 10^{-9} M bzw. 10^{-10} M synthetischem SIINFEKL- (A) bzw. m139₄₁₉₋₄₂₆- (B) Peptid generiert worden. Die Auswertung erfolgte wie in 3.6.6 beschrieben.

Da EL-4 Zellen nicht produktiv mit mCMV infizierbar sind, mussten sie für die Analyse der Erkennung infizierter Zellen durch MEF ersetzt werden. Auch hier wurde zunächst die Erkennung der MEF nach exogener Beladung mit synthetischem Peptid getestet. Dafür wurden C57BL/6 MEF mit einer log₁₀ Titration des entsprechenden antigenen Peptids exogen beladen (siehe 3.6.4.2). Im *ELISpot*-Assay wurde dann die IFN γ Freisetzung der als Effektorzellen eingesetzten SIINFEKL- bzw. m139-spezifischen CTLL gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch exogen beladene MEF von der jeweiligen CTLL erkannt werden. Wie Abb. 30 zeigt, veränderte auch eine IFN γ Vorinkubation der MEF die Erkennung der exogen beladenen Zellen nicht.

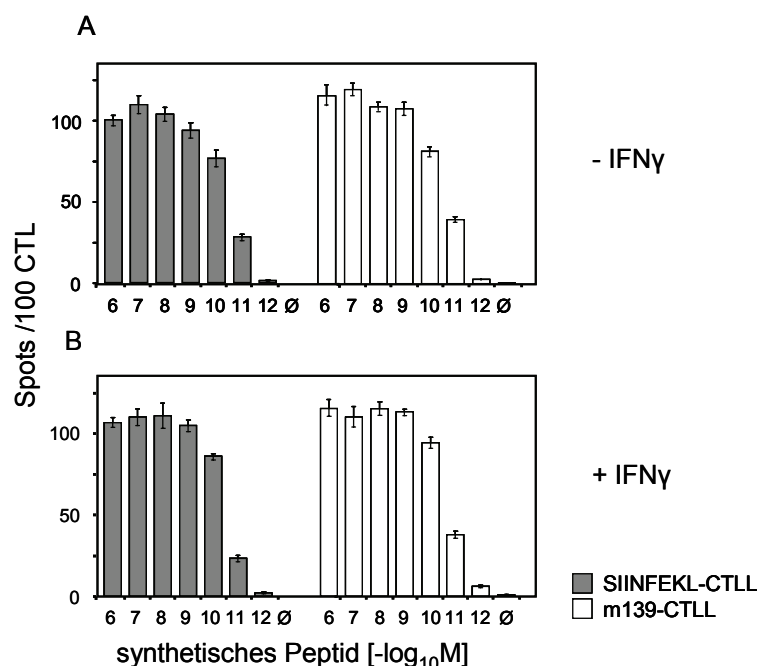


Abb. 30: Nachweis der Erkennung von exogen beladenen MEF durch SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen

Nicht vorbehandelte (A) bzw. für 48h mit IFN γ vorbehandelte (B) C57BL/6 MEF wurden jeweils mit einer \log_{10} -Titration synthetischer Peptide exogen beladen und in einem IFN γ -*ELISpot*-Assay als APC eingesetzt. Als Effektorzellen dienten polyklonale CTLL nach der 3. Restimulation. Zur Kontrolle wurden MEF ohne Peptidbeladung mitgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Abb. 27 beschrieben.

4.7.3 Erkennung infizierter MEF durch CTLL

In den vorangegangenen Experimenten konnte die Aktivierung von Peptid-spezifischen CTLL durch exogen beladene MEF nachgewiesen werden (siehe 4.7.2). Im weiteren Verlauf sollte nun der Nachweis der endogenen Präsentation von SIINFEKL mit Hilfe dieser CTLL erfolgen. Dabei sollten die Effektorfunktionen der CTLL im Zytolyse-Assay und im IFN γ -*ELISpot*-Assay ermittelt werden.

Nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL werden die vRAPs exprimiert und regulieren die Antigenpräsentation auf den infizierten MEF. Da bekannt ist, dass IFN γ die mCMV-Immunevasion aufheben kann (Hengel et al., 1994; Geginat et al., 1997), wurden sowohl IFN γ -vorbehandelte, als auch nicht vorbehandelte C57BL/6 MEF verwendet. Die MEF wurden mit mCMV-vRAP, mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mCMV- Δ -vRAP-SIINFEKL infiziert, durch PAA-Zugabe in der *Early*-Phase arretiert und im jeweiligen Test als APC eingesetzt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte MEF.

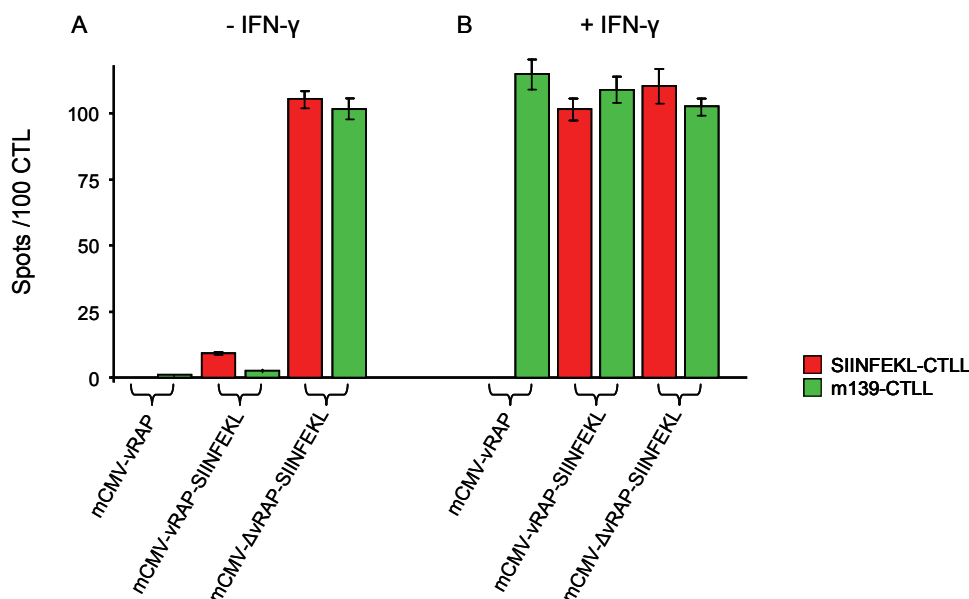
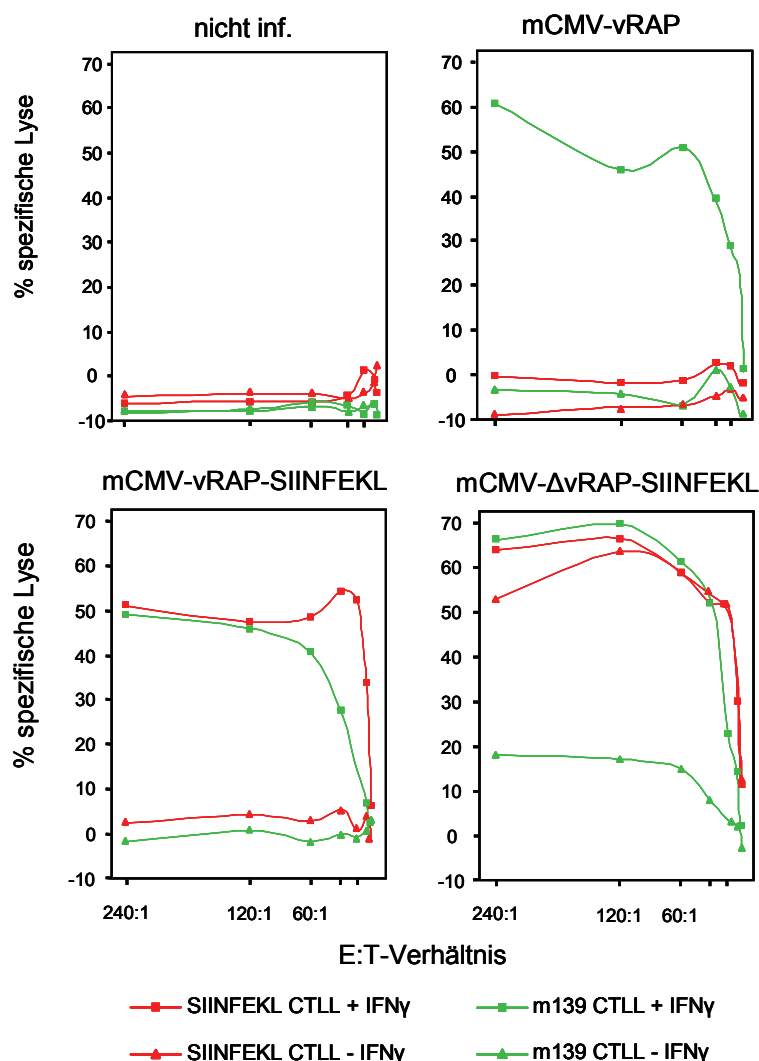


Abb. 31: IFN γ -Sekretion Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen nach Stimulation durch infizierte C57BL/6 MEF

Für den Nachweis der IFN γ -Sekretion aktivierter CD8 T-Zellen wurden nicht mit IFN γ vorbehandelte (A) bzw. vorbehandelte (B) C57BL/6 MEF zentrifugal (MOI 4) mit den entsprechenden Rekombinanten bzw. mCMV-vRAP infiziert und danach in einem 16h IFN γ *ELISpot*-Assay als Simulator-Zellen eingesetzt. Als Effektorzellen dienten SIINFEKL- bzw. m139-spezifische CTLL. Zur Auswertung siehe Abb. 27.

Die in den Abb. 31 (*ELISpot*) und 32 (Zytolyse-Assay) gezeigten Ergebnisse belegen übereinstimmend, dass das integrierte SIINFEKL vergleichbar zu dem m139₄₁₉₋₄₂₆-Peptid präsentiert wurde. Die Deletion der vRAPs führte zur Präsentation der MHC-Klasse-I-Komplexe mit prozessiertem SIINFEKL- bzw. m139-Peptid, die an der Zelloberfläche von den CTL erkannt wurden. Die Erkennung führte dabei zu einer vergleichbaren Aktivierung der CTL. Zum einen kann bei annähernd 100% der spezifischen CTL im *ELISpot*-Assay eine IFN γ -Sekretion nachgewiesen werden, zum anderen lysieren sowohl SIINFEKL- als auch m139-spezifische CTL die infizierten Zielzellen mit vergleichbarer Effizienz. Eine Vorbehandlung mit IFN γ hob den immunmodulatorischen Einfluss der vRAPs auf und führte zu einer Erkennung, die mit der nach Deletion der vRAPs vergleichbar war. Daraus ließ sich ableiten, dass die Präsentation von SIINFEKL in gleicher Weise einer Regulation durch die vRAPs unterlag, wie das virale Peptid m139₄₁₉₋₄₂₆. Die auffällig schlechte Lyse der mit mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL infizierten Zellen (-IFN γ) durch die m139₄₁₉₋₄₂₆ spezifische CTLL (siehe Abb. 32) war nur in diesem Versuch zu beobachten und konnte in weiteren Assays nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).



4.8 Zytofluorometrische Analysen der SIINFEKL-Präsentation

In den vorhergehenden Abschnitten wurde erfolgreich gezeigt, dass nach Infektion mit den rekombinanten Viren mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL das antigene Peptid SIINFEKL effektiv in den MHC-Klasse-I-*Pathway* der Antigen-Prozessierung eingeschleust wurde. Die immunologische Charakterisierung ließ den Schluss zu, dass das durch den orthotopen Peptidaustausch eingebrachte SIINFEKL wie ein virales Peptid präsentiert wird. Deutlich wurde dies insbesondere durch den nachgewiesenen regulatorischen Effekt der vRAPs auf die SIINFEKL-Präsentation. Durch diese Vorarbeiten wurde es möglich, die mCMV-vermittelte Immunevasion mit Hilfe eines Modells zu studieren, das einzigartige Techniken und Tiermodelle erlaubt. Insbesondere bot sich der Nachweis von K^b-SIINFEKL-Komplexen mit dem mAb T-AD 25.D1.16 (Porgador et al., 1997) in zytofluorometrischen Assays an (siehe 4.8.2), mit denen es somit nun erstmals möglich wurde, die Wirkung der mCMV vRAPs direkt anhand der Anzahl der auf der Zelloberfläche präsentierten MHC-Peptid Komplexe zu quantifizieren.

4.8.1 Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I auf C57BL/6 MEF

Es ist davon auszugehen, dass das antigene Peptid SIINFEKL wie ein virales Peptid nach proteasomaler Prozessierung über den TAP ins ER importiert und dort auf MHC-Klasse-I K^b-Moleküle geladen wird (siehe 1.6). Der entstandene K^b-Peptid-Komplex wird danach in den sekretorischen *Pathway* eingeschleust und schließlich an der Zelloberfläche präsentiert. In diesen Transportprozess greifen nach mCMV-Infektion die vRAPs ein und regulieren die Präsentation der MHC-Peptid-Komplexe an der Zelloberfläche (siehe 1.6.3).

Da SIINFEKL über MHC-Klasse-I K^b-Moleküle präsentiert wird, war es zunächst notwendig, die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf C57BL/6 MEF zu überprüfen. Hierzu wurden D^b- und K^b-Moleküle an der Zelloberfläche mit dem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert und zytofluorometrisch analysiert. Wie in Abb. 33 zu sehen ist, zeigten unbehandelte C57BL/6 MEF nur eine geringe Oberflächenexpression an MHC-Klasse-I-Molekülen. Dieses Ergebnis ist nachvollziehbar, da MEF keine professionellen APCs sind. Da bekannt ist, dass eine Vorbehandlung mit IFN γ zu einer Verstärkung der MHC-Klasse-I-Expression führt (Korber et al., 1987), wurden C57BL/6 MEF nach 48h IFN γ -Inkubation gleichfalls auf die MHC-Klasse-I-Expression hin analysiert (siehe Abb. 33). Hier konnte eine deutliche Verstärkung der Oberflächenexpression von D^b und K^b nachgewiesen werden. Im Folgenden wurden aufgrund dieses Ergebnis-

ses alle Zellen für 48h mit IFN γ vorbehandelt, um eine für die Analyse notwendige Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle zu gewährleisten.

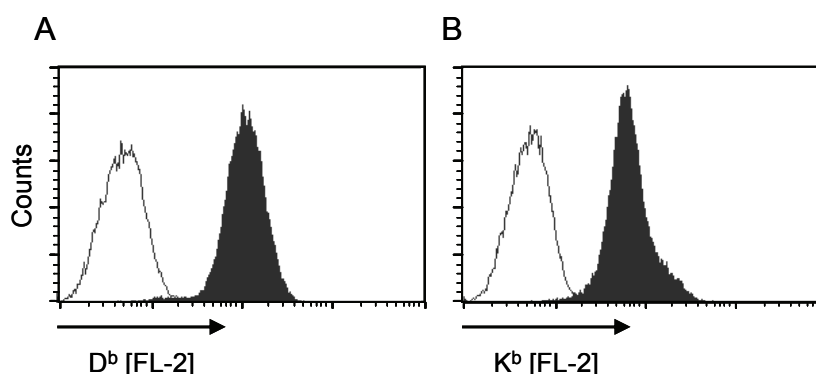


Abb. 33: Histogramm der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf C57BL/6 MEF

Darstellung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von C57BL/6 MEF. Dazu wurden nicht vorbehandelte MEF (weiß) bzw. für 48h mit IFN γ vorbehandelte MEF (schwarz) mit PE-gekoppeltem D^b (A) bzw. K^b (B) Antikörper gefärbt und jeweils 20.000 Zellen zytofluorometrisch analysiert. Die Fluoreszenz von PE wurde dabei in FL-2 detektiert.

4.8.2 Testung des mAb T-AD 25.D1.16 auf exogen mit SIINFEKL beladenen C57BL/6 MEF

Mit dem mAb T-AD 25.D1.16 steht ein Antikörper zu Verfügung, der spezifisch an SIINFEKL-K^b Komplexe bindet. Wie aus zahlreichen Studien bekannt (siehe u. a. Porgador et al., 1997; Princiotto et al., 2003; Jenkins et al., 2006), lassen sich die von diesem Antikörper markierten Komplexe zytofluorometrisch nachweisen. In dieser Arbeit sollte nun zunächst versucht werden, das nach Infektion von MEF prozessierte und über K^b präsentierte SIINFEKL auf der Zelloberfläche zu detektieren und im Anschluss daran die Regulation der Präsentation durch die vRAPs zytofluorometrisch zu analysieren.

Nachdem es möglich war, die Menge der an der Oberfläche von C57BL/6 MEF präsentierten K^b-Komplexe durch IFN γ -Vorbehandlung deutlich zu erhöhen, wurde die Erkennung von SIINFEKL-K^b-Komplexen durch den mAb T-AD 25.D1.16 untersucht. Hierfür wurden IFN γ -vorbehandelte MEF mit log₁₀-titriertem synthetischem SIINFEKL-Peptid exogen beladen (siehe 3.6.4.2) und mit T-AD 25.D1.16 markiert. Zum Vergleich dazu wurde die Gesamtexpression von K^b an der Zelloberfläche bestimmt.

Es ist in Abb. 34 deutlich zu erkennen, dass nach Beladung der Zellen mit SIINFEKL die SIINFEKL-K^b Komplexe konzentrationsabhängig bis zu einer Konzentration von 10⁻⁸M nachweisbar waren.

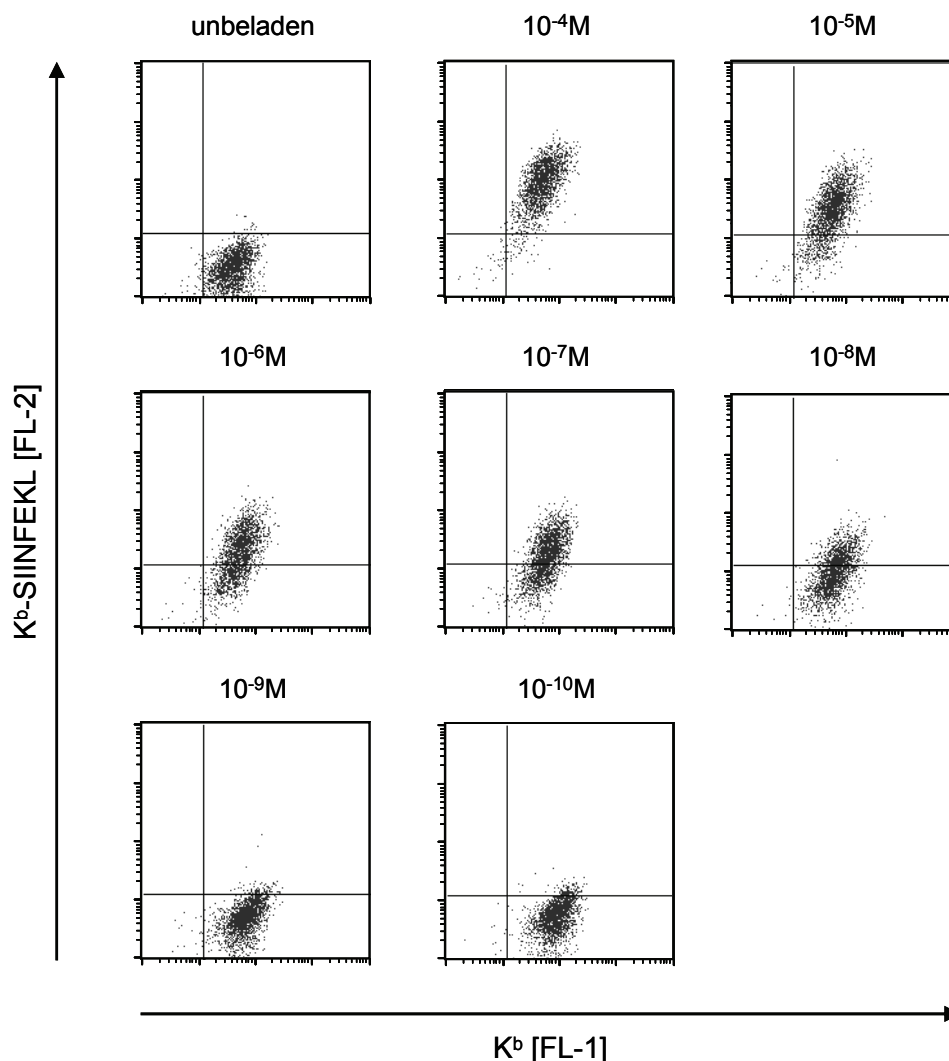


Abb. 34: Spezifische Erkennung von SIINFEKL- K^b -Komplexen durch den mAb T-AD 25.D1.16 nach exogener Beladung von C57BL/6 MEF

Für 48h mit IFN γ vorbehandelte C57BL/6 MEF wurden für 1h mit der jeweiligen Peptid-Konzentration (10^{-4} - 10^{-10} M) inkubiert. Nach Waschen wurden auf der Zelloberfläche die SIINFEKL- K^b -Komplexe mit dem mAb T-AD 25.D1.16 (1:100) und einem PE-gekoppelten Ziege- α -Maus-Antikörper gefärbt. Gleichzeitig wurden die K^b -Moleküle mit einem FITC-konjugierten Antikörper markiert. Für jede Probe wurden 20.000 Zellen analysiert und 2.000 Ereignisse dargestellt. Die Messung der FITC-Fluoreszenz erfolgte in FL-1, die der PE-Fluoreszenz in FL-2.

4.8.3 SIINFEKL-Präsentation auf der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF

In ersten zytofluorometrischen Studien konnte gezeigt werden, dass auf exogen mit SIINFEKL-beladenen MEF spezifische SIINFEKL- K^b -Komplexe durch den mAb T-AD 25.D1.16 nachzuweisen waren. Wie zuvor in 4.7.3 beschrieben erkennen SIINFEKL-spezifische CTL präsentierte SIINFEKL auf der Oberfläche infizierter MEF. Basierend auf diesen beiden Befunden sollte im Folgenden versucht werden, nach Infektion mit den Viren mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL auf der Oberfläche infi-

zierter Zellen SIINFEKL- K^b -Komplexe zytofluorometrisch nachzuweisen. Gleichzeitig war zu überprüfen, ob eine IFN γ -Vorbehandlung Einfluss auf die Präsentation des prozessierten SIINFEKL-Peptids hat.

Hierzu wurden unbehandelte und IFN γ vorbehandelte MEF mit den Viren mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL infiziert und dem mAb T-AD 25.D1.16 sowie einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Anschließend erfolgte die zytofluorometrische Analyse der SIINFEKL- K^b -Präsentation.

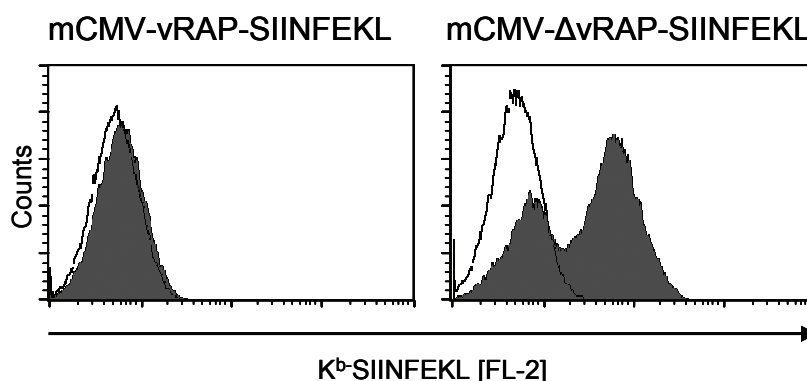


Abb. 35: Histogramm des Einflusses von IFN γ auf die Präsentation von SIINFEKL- K^b -Komplexen nach Infektion mit rekombinanten mCMV

Nicht vorbehandelte MEF (weiß) bzw. für 48h mit IFN γ vorbehandelte MEF (grau) wurden zentrifugal mit einer MOI von 4 mit mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL infiziert. Die Zellen wurden 16h p.i. mit dem mAb T-AD 25.D1.16 und einem PE-gekoppelten α -Maus-Sekundärantikörper gefärbt und 20.000 Zellen analysiert. Die Messung der PE-Fluoreszenz erfolgte dabei in FL-2.

Auf nicht mit IFN γ vorbehandelten MEF waren nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL oder mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL zytofluorometrisch keine SIINFEKL- K^b -Komplexe nachweisbar (Abb. 35, weiße Kurve). Auf IFN γ vorbehandelten (Abb. 35, graue Kurven), mit mCMV-vRAP infizierten MEF wurden gleichfalls keine K^b -SIINFEKL-Komplexe erkannt. Erst die Kombination von IFN γ -Vorbehandlung und Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL führte zur Detektion der Komplexe. Der nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL zu beobachtende Doppelgipfel (Abb. 35 B) deutet auf zwei Zell-Populationen hin: eine infizierte, SIINFEKL- K^b -präsentierende (Abb. 35, rechter Gipfel) und eine nicht-infizierte (Abb. 35, linker Gipfel) Population (siehe auch Abb. 36).

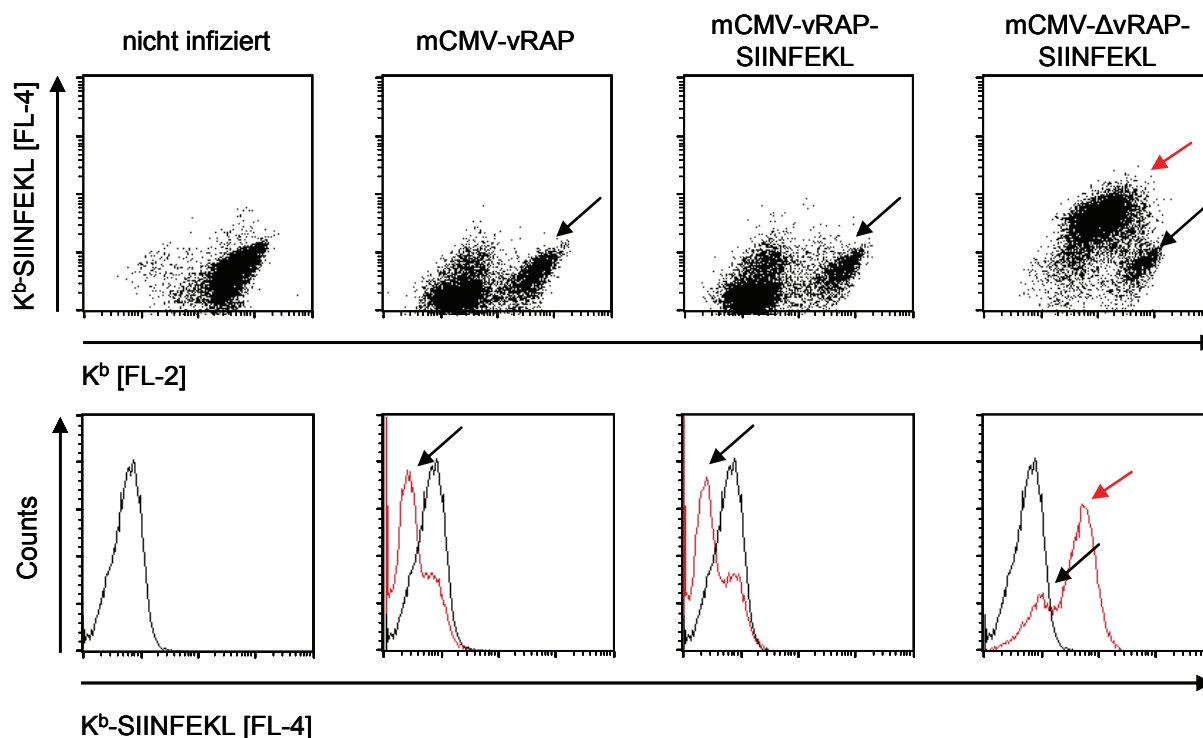


Abb. 36: Nachweis von SIINFEKL- K^b Komplexen auf der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF

Für 48h IFN γ vorbehandelte C57BL/6 MEF wurden zentrifugal infiziert (MOI 4). Die SIINFEKL-Komplexe wurden 16h p.i. mit dem mAb T-AD 25.D1.16 und einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper (FL-4) gefärbt. Zusätzlich wurde die Gesamtheit der K^b -Komplexe mit einem PE-konjugierten α - K^b -Antikörper (FL-2) nachgewiesen.

(Oben) Abtragung der K^b -SIINFEKL-Expression gegen die Gesamtexpression von K^b . (Unten) Abtragung der K^b -SIINFEKL-Expression (rot) im Histogramm im Vergleich zu nicht infizierten MEF (grau). In jeder Gruppe wurden 20.000 Zellen analysiert.

Wie aus Abb. 36 ersichtlich ist, erlaubte die Zytofluorometrie gleichzeitig die Analyse der Oberflächenexpressionen von K^b -Molekülen und SIINFEKL-beladenen K^b -Komplexen. Hierbei wurde deutlich, dass die vRAPs sowohl nach Infektion mit mCMV-vRAP als auch mit mCMV-vRAP-SIINFEKL die K^b -Expression auf der Mehrheit der Zellen herabregulierten. Gleichzeitig war in diesen beiden Gruppen keine SIINFEKL-Präsentation nachzuweisen. Die Deletion der vRAPs in der Rekombinante mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL erhöhte die Expression von K^b wieder deutlich und führte zum Nachweis der Präsentation von SIINFEKL (Abb. 36, roter Pfeil). In jeder Probe war eine Population von Zellen erkennbar, deren K^b -Moleküle keiner Regulation unterliegen und somit wahrscheinlich nicht produktiv infiziert waren (Abb. 36, schwarze Pfeile).

4.8.4 Vergleich der SIINFEKL-Präsentation auf endogen und exogen beladenen C57BL/6 MEF

Während einer Virus-Infektion werden virale Peptide endogen prozessiert, über den TAP-Komplex in das ER transloziert und dort auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Im Anschluss daran werden die reifen MHC-Peptid-Komplexe an die Oberfläche transportiert, um dort den CD8 T-Zellen präsentiert zu werden. Nach mCMV-Infektion greifen die vRAPs in diesen Transport ein und verhindern die Präsentation der MHC-Peptid-Komplexe. Wie im *ELISpot-Assay* (siehe 4.7.3) und in zytofluorometrischen Messungen (siehe 4.8.3) gezeigt werden konnte wird auch SIINFEKL nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL vergleichbar einem viralen Peptid prozessiert und reguliert. Während der endogenen Beladung kommt es zur Konkurrenz einzelner Peptide um die Bindung an den TAP-Komplex und das leere MHC-Klasse-I-Molekül. Durch diese Konkurrenz bedingt werden vorrangig hochaffine Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert. Zu diesen muß folglich auch SIINFEKL gehören.

Interessant war nun die Untersuchung einer exogenen Beladung von Zellen mit SIINFEKL im Kontext der mCMV-Infektion. Da hierbei die Mehrheit der an der Zelloberfläche präsentierten MHC-Klasse-I-Komplexe mit viralen Peptiden besetzt sein sollte, stellte sich die Frage ob SIINFEKL nach exogener Beladung auf mCMV-infizierten Zellen präsentiert wird.

Wie in den vorangegangenen Messungen wurden für diese Analyse C57BL/6 MEF mit IFN γ vorbehandelt und im Anschluss daran mit den entsprechenden Viren (mCMV-vRAP, mCMV- Δ vRAP bzw. mCMV-vRAP-SIINFEKL, mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL) infiziert. 16h p.i. wurden die Zellen abgelöst und die mit mCMV-vRAP oder mCMV- Δ vRAP infizierten Zellen exogen mit synthetischem SIINFEKL-Peptid (10^{-4} M) beladen (siehe 3.6.4.2). In gleicher Weise wurden als Kontrolle dienende nicht infizierte Zellen beladen. Somit standen für die Messung 3 Gruppen exogen (nach Infektion mit mCMV-vRAP oder mCMV- Δ vRAP bzw. nicht infiziert) und 2 Gruppen endogen beladener Zellen (nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL und mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL) zur Verfügung. Diese wurden nach Dreifach-Färbung (K^b -SIINFEKL, K^b , m164/gp36,5) zytofluorometrisch analysiert; dabei diente eine Färbung des m164/gp36,5 als Infektionsmarker.

Die Auswertung in Abb. 37 zeigt die Beladung von K^b -Komplexen mit SIINFEKL (Abb. 37, Reihe 1). Deutlich ist hier der Unterschied zwischen endogener und exogener Beladung zu erkennen. Nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL konnten endogen mit SIINFEKL beladene K^b -Komplexe nur auf infizierten, m164/gp36,5 positiven Zellen nachgewiesen werden. In den exogen mit SIINFEKL beladenen Gruppen konnten auf allen

nichtinfizierten, m164/gp36,5 negativen Zellen SIINFEKL- K^b -Komplexe detektiert werden. Auf infizierten Zellen war nur nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP eine Beladung mit SIINFEKL nachweisbar. Mit mCMV-vRAP infizierte Zellen ließen sich hingegen nicht beladen. Dieser Befund korrespondierte mit der Herabregulation der K^b -Moleküle nach vRAP-Expression (Abb. 37, Reihe 2).

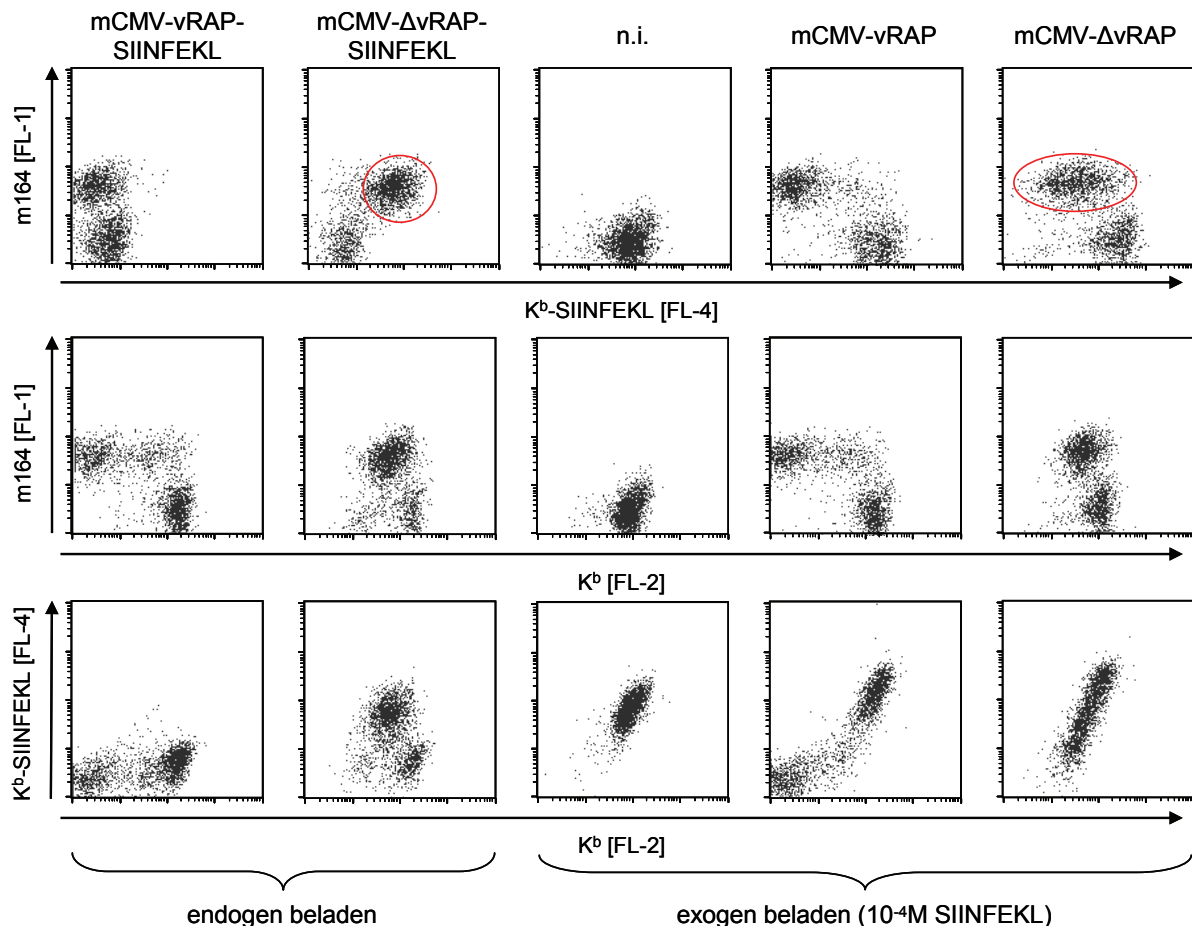


Abb. 37: Nachweis von endogen und exogen mit SIINFEKL beladenen MHC-Klasse-I K^b -Molekülen

IFN γ vorbehandelte C57BL/6 MEF wurden zentrifugal mit den oben genannten Viren infiziert (MOI 4), als Infektanten wurden nicht infizierte Zellen (n.i.) mitgeführt. 16h p.i. erfolgte eine exogene Beladung der Zellen mit synthetischem SIINFEKL-Peptid (10⁻⁴M). Im Anschluss daran erfolgte die Färbung der SIINFEKL-Komplexe mit dem mAb T-AD 25.D1.16 und einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper (FL-4). Zum Nachweis der K^b -Expression an der Oberfläche diente die Färbung mit einem PE-konjugierten α - K^b -Antikörper (FL-2). Das als Infektionsmarker dienende m164/gp36,5 wurde mit der Kombination aus α -m164/gp36,5 und einem Alexa-448-gekoppelten Sekundärantikörper (FL-1) nachgewiesen. m164/gp36,5 positive, SIINFEKL- K^b -Komplexe tragende Zellen sind in Reihe 1 rot umrandet. In jeder Gruppe wurden 20.000 Zellen analysiert und 2.000 Ereignisse dargestellt.

Wenn wie in Abb. 37, Reihe 3 K^b und K^b -SIINFEKL einander gegenübergestellt wurden, fiel auf, dass die Effizienz der exogenen Beladung mit der Oberflächenexpression von K^b korreliert. Die Zellen lagen entlang einer Geraden und ließen damit eine direkte Abhängigkeit der Zahl exogen beladbarer K^b -Moleküle von der Zahl der absolut an der Oberfläche vorhandenen K^b -Komplexe vermuten. Nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL konnte demgegenüber diese Abhängigkeit nicht gezeigt werden.

Zusammenfassung: Mit Hilfe des mAb T-AD 25.D1.16 konnte zytofluorometrisch die Präsentation von SIINFEKL- K^b -Komplexen nachgewiesen werden. Nach Infektion mit SIINFEKL-exprimierenden mCMV-Rekombinanten war für den Nachweis einer endogenen SIINFEKL-Präsentation die Deletion der vRAPs notwendig.

4.9 Zytofluorometrische Quantifizierung der Präsentation von MHC-Klasse-I präsentierten Peptiden

Die mCMV-Infektion wird sowohl in der Akut-Phase der Infektion als auch während der späteren Latenz effektiv von Virus-spezifischen CD8 T-Zellen kontrolliert (Quinnan et al., 1978; Reddehase et al., 1985; 1987; Simon et al., 2006). Da CD8 Zellen bereits von einer sehr geringen Zahl an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen aktiviert werden (Brower et al., 1994; Sykulev et al., 1994; 1996), stellt sich die Frage, wie eine mCMV-infizierte Zelle trotz Schutz der vRAPs von der T-Zelle erkannt werden kann. Es kann spekuliert werden, ob hier einzelne Peptide der Kontrolle der vRAPs entkommen oder ob es im Verlauf der Infektion zu Sättigungseffekten der Immunevasion kommt, die die Präsentation von viralen Peptiden ermöglichen. Zur Aufklärung dieser Frage und zur Abschätzung der Effektivität der viralen Immunevasion ist das quantitative Verständnis von Peptid-Generierung, -Präsentation sowie der Beeinflussung durch die vRAPs unerlässlich.

Seit 1990 sind verschiedene Methoden zur quantitativen Untersuchung von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen beschrieben worden. Einen direkten Ansatz zur Identifikation und Quantifizierung von prozessierten Peptiden entwickelten Rötzschke et al. (1990). In ihm werden die aus Zellextrakten biochemisch isolierten Peptide mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) fraktioniert und durch *in vitro* Assays mit CD8 T-Zellen nachgewiesen. Bei bekanntem Peptid erlaubt diese Technik zusätzlich die Quantifizierung des extrahierten Peptids durch einen Vergleich mit einem synthetischen Peptidstandard. Die dabei ermittelte Peptidmenge gibt allerdings nur eine Untergrenze an, da sich die Effizienz der Aufreinigung nicht genau angeben lässt.

Eine genauere Bestimmung der Bindung der Peptide lässt die exogene Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit radioaktiv [125 I] markiertem Peptid zu. Die in den aufgereinigten in den HPLC -Fraktionen gemessene Radioaktivität ist proportional zur Zahl der gebundenen Peptide (Sykulev et al., 1994) und lässt damit Rückschlüsse auf die Zahl der gebundenen Peptide zu.

Weitere Hilfsmittel zur Quantifizierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen an Zelloberflächen sind monoklonale Antikörper, die einen spezifischen T-Zell Rezeptor nachahmen (Andersen et al., 1996; Porgador et al., 1997), oder lösliche, multivalente T-Zell Rezeptoren (O'Herrin et al., 1997), mit denen hochspezifische zytofluorometrische Quantifizierungen an den Oberflächen einzelner und sogar noch lebender Zellen durchgeführt werden können.

4.9.1 Die Methoden der zytofluorometrischen Quantifizierung

Für eine zytofluorometrische Quantifizierung von Zelloberflächen-Antigenen, wie z. B. TCR oder MHC-Klasse-I-Molekülen stehen derzeit drei Kit-Systeme kommerziell zur Verfügung. Dies sind das QuantiBRITE (BD Bioscience), das QIFIKIT (DAKO Cytomation) und das *Quantum Simply Cellular* (poly-sciences Europe) (für einen Vergleich der Techniken siehe Lenkei et al., 1998).

Mit diesen Kits ist es möglich den Prozentsatz der antigenpositiven Zellen einer Zellpopulation sowie die Antigendichte auf der Zelloberfläche zu bestimmen. Die Kits beruhen alle auf einem indirekten Immunfluoreszenz-Assay (Poncelet & Carayon, 1985), der die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen einem Standard und einer zu analysierenden Probe vergleicht. Der in dieser Arbeit verwendete QIFIKIT hat von allen erhältlichen Methoden die größte Flexibilität, da in ihm ein Standard verwendet wird, der den Einsatz verschiedener mAb zur Markierung der zu analysierten Probe erlaubt. Dieser Standard besteht aus Populationen sogenannter *MicroBeads*, an deren Oberfläche bekannte Mengen monoklonaler Maus-Antikörper (α -human CD5, Isotyp IgG) vom Hersteller gekoppelt wurden (siehe Abb. 38). Die zu analysierende Probe wird vor ihrer Analyse vom Nutzer mit dem gewünschten Primär-Antikörper (Maus, Isotyp IgGx) markiert und im Anschluss daran parallel zum Standard mit einem FITC-konjugierten F(ab)₂-Fragments (α -Maus) gefärbt.

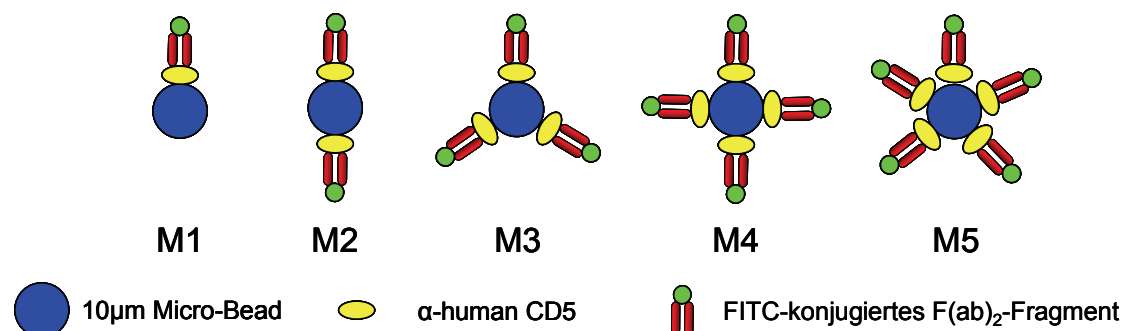


Abb. 38: Schematische Darstellung der QIFIKIT-Beads

Die 10µm großen *MicroBeads* sind mit einer definierten Zahl von monoklonalen α-humanen CD5 Antikörpern beladen. Diese können nach Bindung eines FITC-konjugierten F(ab)₂-Fragments (α-Maus) zytofluorometrisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 39).

4.9.1.1 Quantifizierungen von Zelloberflächenantigenen mit Hilfe des QIFIKIT

Der Hersteller des für die absolute Quantifizierung von Zelloberflächenantigenen eingesetzten QIFIKIT (Dako, Hamburg, Nr. K0078) liefert als Standard zur Kalibrierung der Messung eine Mischung von fünf Antikörper-beladenen *Beads*. Die genaue Zahl der an der Oberfläche befindlichen Antikörper (α-humanes CD5, Klon ST1, Isotyp IgG2a) wurde für die jeweilige Charge vom Hersteller ermittelt und angegeben. Zusätzlich werden zur Konfiguration des Zytofluorometers noch sogenannte „*Set-up*“-*Beads* mitgeliefert. Sowohl die Kalibrations- als auch die „*Set-up*“-*Beads* wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und parallel zu der zu messenden Probe mit einem FITC-gekoppelten F(ab)₂-Fragment gefärbt (siehe 3.6.7.3).

Für die zytofluorometrische Messung wurde zunächst mit Hilfe der „*Set-up*“-*Beads* sowie mit ungefärbten Zellen der Messbereich so festgelegt, dass sowohl *Beads* als auch Zellen messbar waren (siehe Abb. 39). Danach erfolgte die Messung der Kalibrations-*Beads* (siehe Abb. 39) und der Proben. Es galt dabei zu beachten, dass alle Messungen zur gleichen Zeit und ohne Veränderungen der Einstellungen des Zytofluorometer durchgeführt wurden.

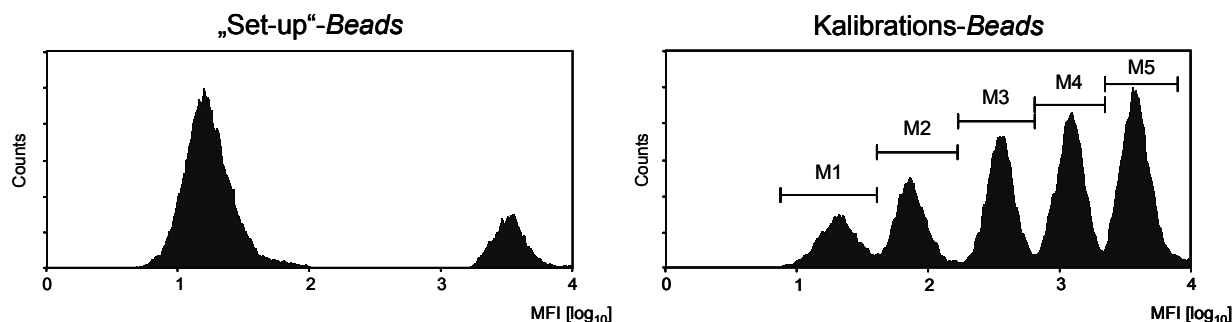


Abb. 39: Histogramme der „Set-up“-Beads und Kalibrations-Beads des QIFIKIT

Exemplarische Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der mit α -Maus-F(ab)₂ FITC-markierten *Beads*. Im Histogramm der Kalibrations-*Beads* sind Marker zur Bestimmung der MFI der einzelnen Populationen eingezeichnet (M1-M5).

Für die Erstellung der Kalibrierungsgerade aus der in Abb. 39 B gezeigten Messung wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der *Bead*-Populationen unterhalb gesetzter Marker (M1-M5) bestimmt. Die gemessene MFI korreliert durch den Einsatz saturierender Antikörperkonzentrationen direkt mit der an der Oberfläche der *Beads* oder Zellen vorhandenen Bindungsstellen. Durch einfache Regressionsanalyse lässt sich die Zahl der Bindungsstellen ermitteln (siehe Abb. 40). In der doppellogarithmischen Darstellung besteht zwischen dem Logarithmus der MFI und dem Logarithmus der Zahl der Bindungsstellen eine lineare Abhängigkeit, die somit mit folgender Gleichung dargestellt werden kann.

$$\log(\text{ABC}) = a \times \log(\text{MFI}) + b$$

ABC ist dabei die *Antibody-Binding Capacity* der Probe und entspricht der Zahl der Bindungsstellen auf den *Beads* oder Zellen (Schwartz & Fernández-Repollet, 1994). MFI ist die gemessene mittlere relative Fluoreszenzintensität.

Mit Hilfe der nach ABC aufgelösten Gleichung lässt sich die Zahl der entsprechenden Bindungsstellen der Probe bestimmen.

$$\text{ABC} = 10^{(\log(\text{ABC}))}$$

Im Gegensatz zu Lymphozyten zeigen die für die Experimente verwendeten MEF generell eine stärkere Autofluoreszenz. Dies macht eine Korrektur der berechneten Werte der ABC durch das *Background Antibody Equivalent* (**BAE**) erforderlich. Das BAE lässt sich aus der MFI einer Probe, die mit einem nicht-bindenden Primärantikörper inkubiert wurde, bestimmen.

Die Korrektur erfolgt dann durch

$$\text{SABC} = \text{ABC} - \text{BAE}$$

mit SABC als *Specific Antibody-Binding Capacity*.

Der so ermittelte Wert entspricht damit der Zahl der ermittelten Antikörper-Bindungen. Diese entspricht wiederum, da monoklonale Antikörper nach der Bindung ihre jeweilige Bindungsstelle abschirmen, der Zahl der an der Oberfläche befindlichen Antigene (z. B. ein Rezeptor wie CD8 oder MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe).

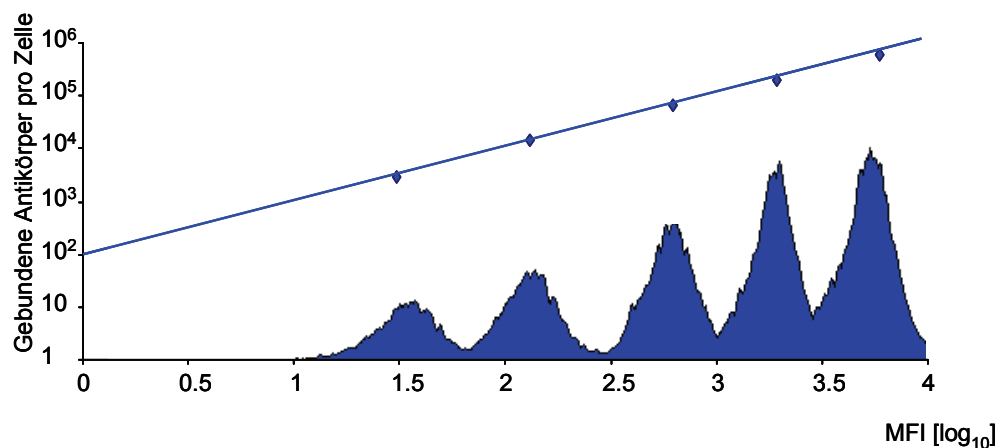


Abb. 40: Histogramm einer Messung von Kalibrations-Beads und Darstellung der ermittelten Regressionsgerade

Kombination des Histogramms einer exemplarischen Messung der Kalibrations-Beads mit der entsprechenden Regressionsgeraden. Zur Bestimmung der Geradengleichung wurden die gemessenen MFI der einzelnen Populationen gegen die bekannten ABC doppellogarithmisch aufgetragen.

Zusätzlich kann aus der Regressionsgeraden die theoretische Sensitivität der Assays abgeleitet werden. Sie entspricht dem Achsenabschnitt der Geraden und liegt in der Größenordnung von etwa 100 Moleküle pro Zelle.

4.9.2 Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die Gesamt-MHC-Klasse-I-Expression

Während der akuten mCMV-Infektion verhindert die kombinierte Wirkung der vRAPs m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 die Erkennung der infizierten Zelle durch CD8 T-Zellen (zur Übersicht Reddehase, 2002). Die vRAPs beeinflussen dabei den intrazellulären Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen, mit dem Resultat, dass die Zelloberfläche an diesen verarmt (siehe auch 1.6.3).

Bisherige Studien zum Einfluss der vRAPs auf die Oberflächenexpression setzten ihre Schwerpunkte vorrangig in qualitative Untersuchungen der Wirkung der vRAPs auf MHC-Klasse-I-Moleküle des Haplotyps H-2^d und H-2^b (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006a) oder auf ihre Rolle bei der Erkennung von infizierten Zellen durch CD8 T-Zellen (Kavanagh et al., 2001a; Lo Piccolo et al., 2002; Holtappels et al., 2006a; Böhm et al., 2008). Bislang konnte allerdings keine absolute Quantifizierung der Gesamt-Immuneva-

sion von mCMV durchgeführt werden. Durch die Generierung von Viren mit integriertem SIINFEKL-Peptid bestand nun zum ersten Mal die Möglichkeit, spezifisch ein im Kontext einer mCMV-Infektion mit Peptid beladenes MHC-Klasse-I-Molekül nachzuweisen und zu quantifizieren.

Zunächst sollte die Gesamtexpression der K^b -Moleküle an der Oberfläche von MEF bestimmt und der immunevasive Effekt der vRAPs auf alle K^b -Moleküle quantifiziert werden. Hierfür wurden C57BL/6 MEF mit mCMV-vRAP, mCMV- Δ vRAP, mCMV-vRAP-SIINFEKL sowie mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL zentrifugal infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. 16h p.i. wurden die Zellen abgelöst und die K^b -Oberflächen-Moleküle mit einer Kombination von monoklonalem α - K^b und FITC-konjugiertem F(ab)₂-Fragment gefärbt. Danach erfolgte die Markierung der infizierten Zellen durch eine intrazelluläre m164/gp36,5 Färbung (α -m164/gp36,5; α -rabbit-Alexa546). Jeweils eine Probe wurde mit einem nicht-bindenden mAb (α -HCMV pp65, Klon C10/C11, Isotyp IgG1) gefärbt, um die BAE zu bestimmen.

Nach Festlegung der Einstellungen des Zytofluorometers durch Messung der „Set-up“-Beads wurde zunächst die Kalibrierungsgerade aufgenommen (siehe Abb. 40). Im Anschluss daran wurden in den jeweiligen Gruppen sowohl m164/gp36,5 positive (infizierte) als auch m164/gp36,5 negative (nicht infizierte) Zellen auf ihre K^b -Expression hin analysiert. Hierfür wurden entsprechende elektronische Auswertefenster (Gates) um die auszuwählenden Zellpopulationen gesetzt und im Histogramm die entsprechenden MFI ermittelt (siehe Abb. 41 A). Durch Korrektur mit der BAE konnte die SABC wie in 4.8.5.2 beschrieben bestimmt werden. Eine entsprechende graphische Auswertung ist in Abb. 41 B gezeigt.

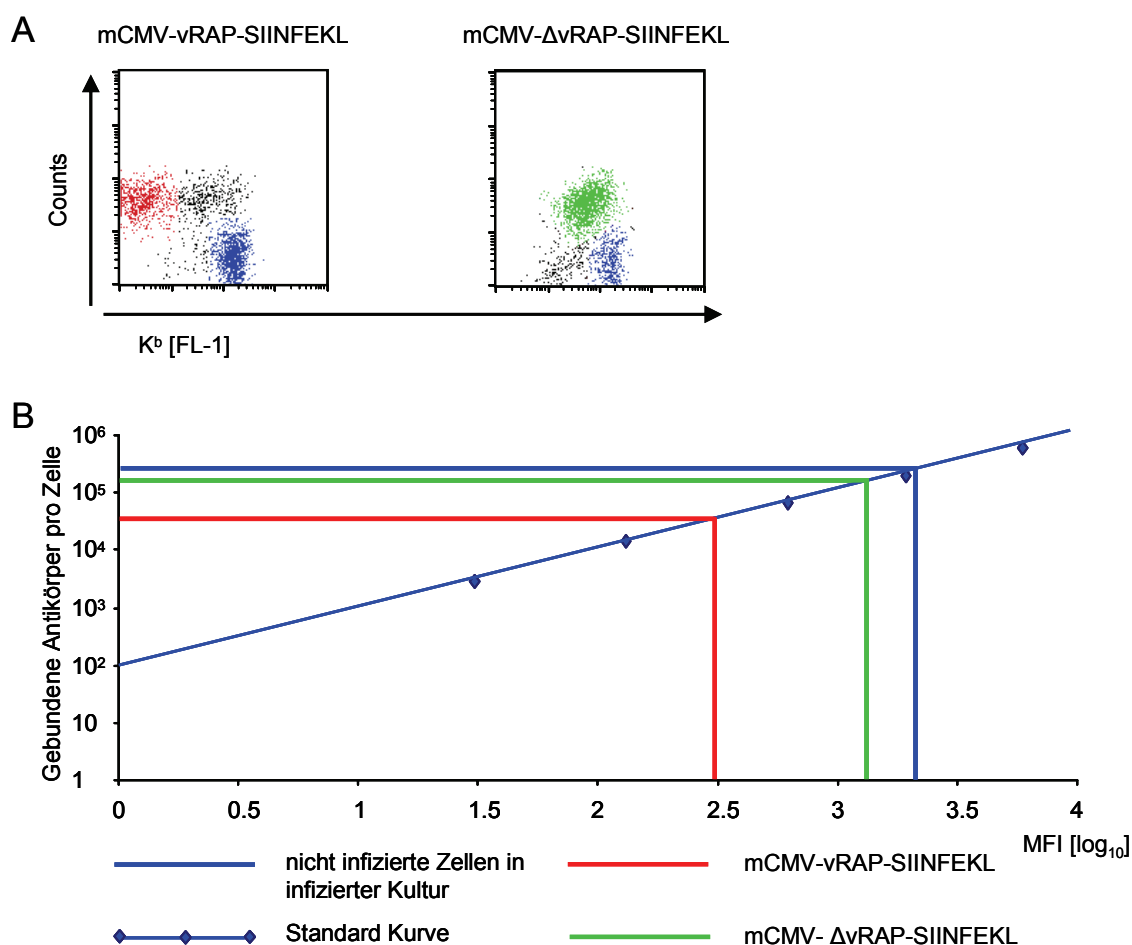


Abb. 41: K^b-Expression auf der Oberfläche infizierter MEF

Die Oberflächenexpression von K^b-Molekülen IFN γ vorbehandelter MEF wurde 16h nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL (zentrifugale MOI 4) quantifiziert. Hierzu wurden zunächst die Zellen abgelöst und die Oberflächen-K^b-Moleküle mit α -K^b und FITC-konjugiertem F(ab)₂-Fragment (FL-1) gefärbt. Danach erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen durch eine intrazelluläre m164/gp36,5 Färbung (α -m164/gp36,5; α -rabbit-Alexa546). Die MFI der m164/gp36,5-positiven (infizierten) und m164/gp36,5 negativen (nicht infizierten) Fraktionen wurden separat bestimmt. (A) Dot-Plot der zur Quantifizierung der K^b-Expression gewählten C57BL/6 MEF-Fractionen. Eingefärbt ist jeweils die Fraktion, die quantifiziert wurde. Es wurden 20.000 Zellen analysiert und 2.000 Ereignisse dargestellt. (B) Graphische Auswertung der Quantifizierung. Die Abtragung der MFI auf der x-Achse ermöglicht mit Hilfe der durch die Kalibrierungs-Beads gewonnenen Standardgerade das Ablesen der Zahl an der Oberfläche der jeweiligen Zellen gebundener Antikörper auf der y-Achse.

Abb. 41 zeigt beispielhaft für eine Quantifizierung von K^b-Molekülen, dass eine nicht infizierte Zelle aus einer infizierten Kultur etwa 3×10^5 K^b-Moleküle auf ihrer Oberfläche trägt. Im Vergleich dazu reduziert die Infektion mit mCMV-vRAP die Oberflächenexpression von K^b auf 4×10^4 Moleküle je Zelle. Nach Infektion mit mCMV-ΔvRAP steigt die Zahl der K^b-Moleküle auf $1,5 \times 10^5$ an. Damit sorgt die Deletion der vRAPs für eine deutliche Steigerung der K^b-Expression, ohne jedoch die Anzahl der K^b-Moleküle auf nicht-infizierten Zellen ganz zu erreichen.

Zur Veranschaulichung des Einflusses der vRAPs auf die K^b -Oberflächenexpression wurden in Abb. 42 die Ergebnisse aller Quantifizierungen (vgl. Anhang, Tab. 15) zusammengefasst. Dabei konnten auf Zellen, die mit einem vRAP-exprimierenden Virus infiziert waren, zwischen $2,4 \times 10^4$ und $5,7 \times 10^4$ K^b -Moleküle pro Zelle (Median 3×10^4) ermittelt werden. Eine Deletion der vRAPs erhöhte die Oberflächenexpression auf $1,1 \times 10^5$ bis $2,3 \times 10^5$ Moleküle (Median $1,2 \times 10^5$) pro Zelle. Auf den nicht infizierten Zellen der infizierten Kulturen konnten zwischen $2,3 \times 10^5$ und $4,2 \times 10^5$ K^b -Moleküle (Median $3,3 \times 10^5$) nachgewiesen werden, während die Zellen aus nicht infizierten Kulturen zwischen $2,4 \times 10^5$ und $3,2 \times 10^5$ K^b -Moleküle (Median $2,5 \times 10^5$) exprimierten. Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass die Expression der vRAPs die Zahl der K^b -Moleküle auf der Zelloberfläche um einen Faktor von 4 reduziert wird.

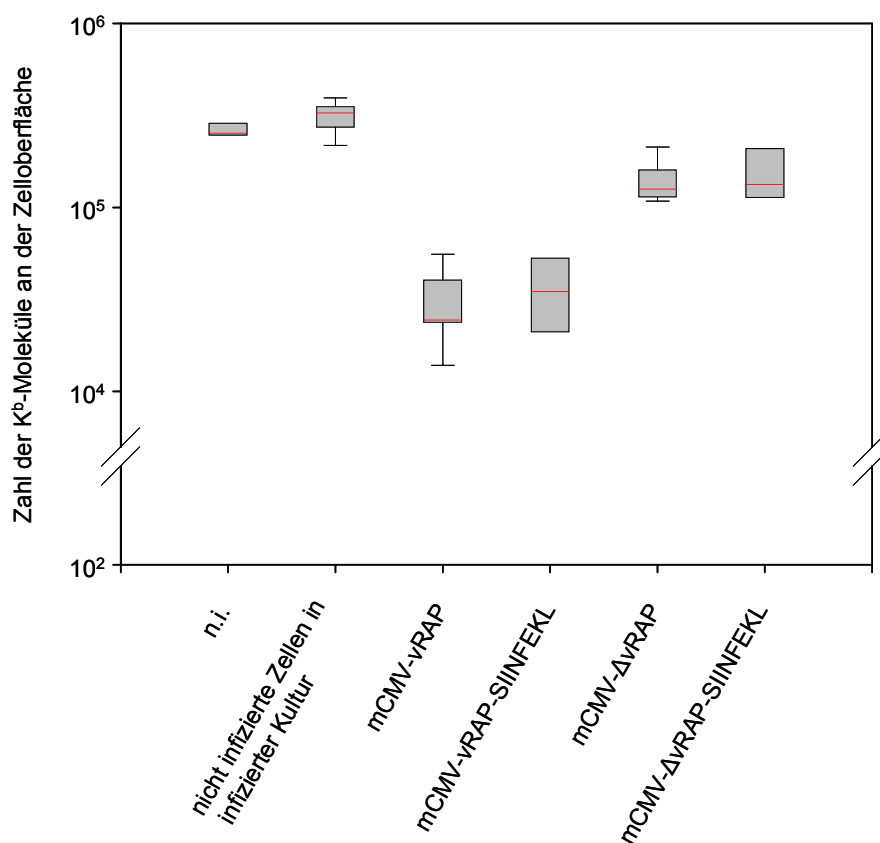


Abb. 42: Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die Zelloberflächenexpression von K^b - auf C57BL/6 MEF

Die Darstellung aller mittels zytofluorometrischer Quantifizierung bestimmten Anzahlen von K^b -Molekülen auf der Zelloberfläche von C57BL/6 MEF erfolgte im *Box-Whisker-Plot*. Dabei wird die Box vom 25% bzw. 75% Quartil der Messwerte begrenzt, die *Whiskers* entsprechen dem 10% bzw. 90% Perzentil der Werte. Zusätzlich ist noch der Median (rot) in den Boxen markiert. Eine Zusammenstellung der Messwerte ist im Anhang (Tab. 15) zu finden.

4.9.3 Quantifizierung der SIINFEKL-Präsentation

Nachdem der starke Einfluss der vRAPs auf die K^b -Oberflächenexpression in 4.8.5.3 molekular quantifiziert werden konnte, sollte nun in analoger Weise die Wirkung der vRAPs auf die mit SIINFEKL beladenen K^b -Molekülen untersucht werden. Auch hierfür wurden IFN γ vorbehandelte MEF zentrifugal (MOI 4) mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL infiziert und 16h p.i. die SIINFEKL- K^b -Komplexe auf der Oberfläche m164-positiver Zellen mit dem mAb T-AD 25.1.16 quantifiziert.

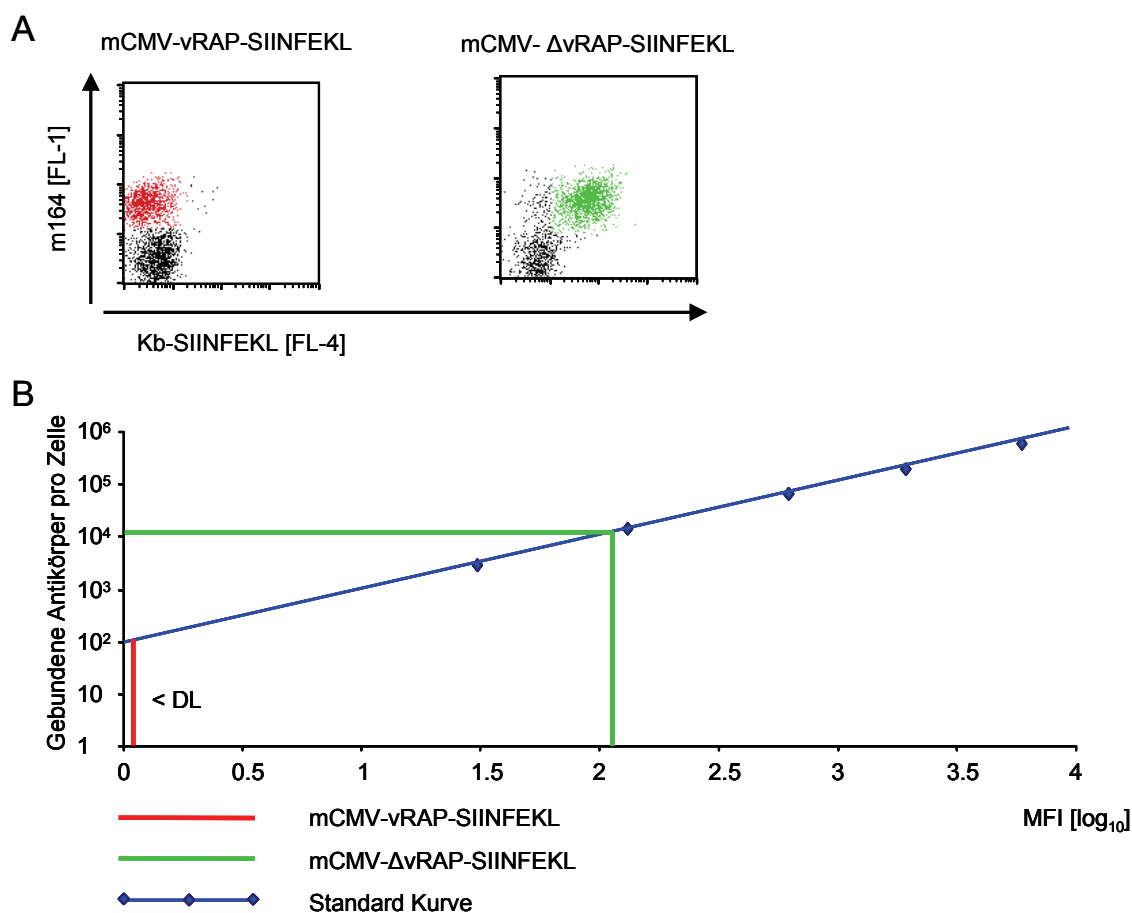


Abb. 43: Quantifizierung der K^b -SIINFEKL-Komplexe an der Oberfläche infizierter C57BL/6 MEF

Die Präsentation von K^b -SIINFEKL-Komplexen auf mit mCMV-vRAP-SIINFEKL bzw. mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL (zentrifugal, MOI 4) infizierten C57BL/6 MEF (IFN γ vorbehandelt) wurde 16h p.i. quantifiziert. Hierzu wurden zunächst die Zellen abgelöst und die K^b -SIINFEKL-Komplexe mit dem mAb T-AD 25.1.16 und FITC-konjugiertem F(ab) $_2$ -Fragment gefärbt. Danach erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen durch eine intrazelluläre m164/gp36,5 Färbung (α -m164/gp36,5; α -rabbit-Alexa546). Die MFI der m164/gp36,5-positiven (infizierten) und m164/gp36,5 negativen (nicht infizierten) Fraktionen wurden separat bestimmt (A) Dot-Plot der zur Quantifizierung der K^b -Expression gewählten C57BL/6 MEF-Fraktionen. Eingefärbt ist jeweils die Fraktion, die quantifiziert wurde. Es wurden 20.000 Zellen analysiert und 2.000 Ereignisse dargestellt. (B) Graphische Auswertung der Quantifizierung. Die Abtragung der MFI auf der x-Achse ermöglicht mit Hilfe der durch die Kalibrierungs-Beads gewonnenen Standardgerade das Ablesen der Zahl gebundener Antikörper auf der y-Achse.

Die Zusammenstellung aller Quantifizierungen (vgl. Anhang, Tab. 16) der K^b -SIINFEKL-Komplexe in Abb. 44 zeigt, dass nur nach Infektion mit der Rekombinante mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL entsprechende Komplexe ($2,7 \times 10^3$ - $1,7 \times 10^4$ Komplexe; Median $1,1 \times 10^4$ Komplexe) auf der Zelloberfläche nachweisbar waren. Auf die jeweils parallel quantifizierten K^b -Moleküle bezogen ergab sich eine Beladung von 3,5 bis 11,7% (Durchschnitt 6,7%) aller mit SIINFEKL. Die weiteren Quantifizierungen nach Infektion mit mCMV-vRAP, mCMV- Δ vRAP sowie für nicht infizierte Zellen lieferten vergleichbare Werte am oder unterhalb des Detektions-Limits (Median ≤ 100 Komplexe) und definieren damit das Assay-Rauschen. Trotzdem konnte bemerkt werden, dass die Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL zu einem geringen Nachweis von SIINFEKL- K^b -Komplexen an der Zelloberfläche führt (Median ~ 200 Komplexe; Beladungs-Quote von $\leq 0,5\%$); wobei diese Werte nicht signifikant gegenüber dem Assay-Rauschen sind. Somit konnte aus den ermittelten Werten gefolgert werden, dass die Expression der vRAPs die Präsentation eines viralen Peptids um weiten Faktor Hundert reduziert. Die Ergebnisse einer K^b -SIINFEKL Quantifizierung sind beispielhaft in Abb. 43 dargestellt und zeigen, dass die Expression der vRAPs nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL die Zahl der K^b -SIINFEKL-Komplexe an der Oberfläche auf einen Wert unterhalb des Detektions-Limits (DL) des Assay reduzierte. Nach Deletion der vRAPs wurde die Präsentation von SIINFEKL wieder deutlich angehoben und ermöglichte die Quantifizierung von $\sim 1,5 \times 10^4$ K^b -SIINFEKL-Komplexen auf der Zelloberfläche.

Wenn nun die Zahl der K^b -SIINFEKL-Komplexe zu der parallel bestimmten Anzahl der Gesamt- K^b -Moleküle (siehe Abb. 41) in Bezug gesetzt wurde, konnte für diese Messung eine SIINFEKL- Präsentation auf $\sim 10\%$ aller K^b -Moleküle nachgewiesen werden (vgl. Anhang, Tab. 18).

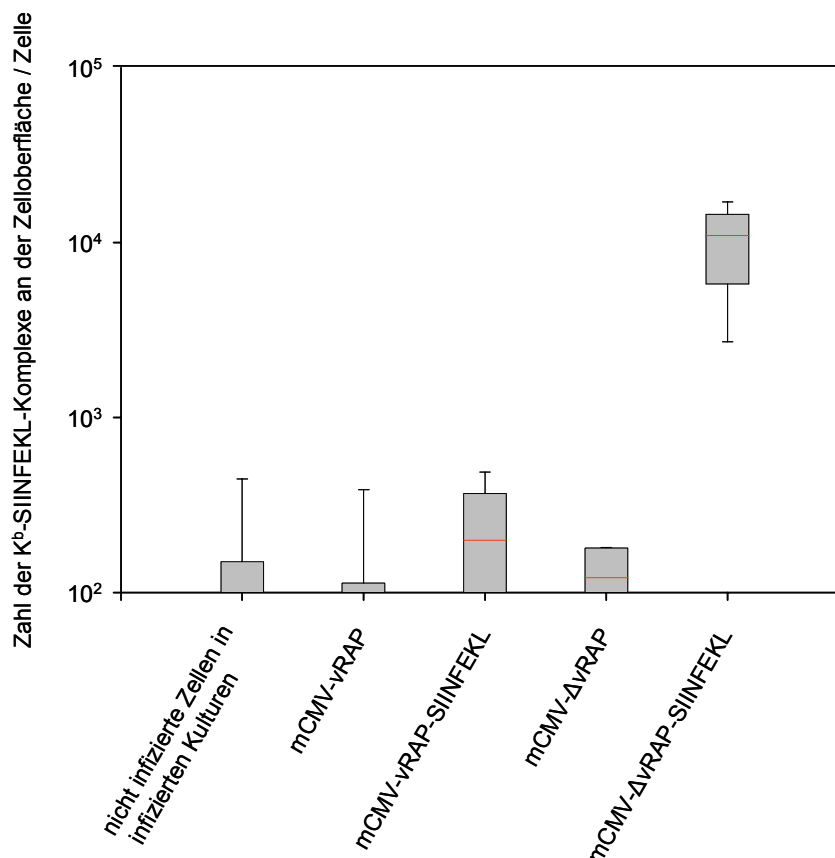


Abb. 44: Quantifizierung des Einflusses der vRAPs auf die K^b-SIINFEKL-Präsentation

Die Darstellung aller mittels zytofluorometrischer Quantifizierung bestimmten Anzahl von K^b-SIINFEKL-Komplexen auf der Zelloberfläche von C57BL/6 MEF erfolgte im *Box-Whisker-Plot*. Dabei wird die Box vom 25% bzw. 75% Quartil der Messwerte begrenzt, die *Whiskers* entsprechen dem 10% bzw. 90% Perzentil der Werte. Zusätzlich ist noch der Median (rot) in den Boxen markiert. Eine Zusammenstellung der Messwerte ist im Anhang (Tab. 16) zu finden.

4.9.4 Quantifizierung der SIINFEKL Präsentation nach exogener Beladung

Die exogene Beladung von APCs stellt eine klassische Methode zur Generierung von Zielzellen für immunologische *in vitro* Assays dar (siehe 3.6.4.2). In welcher Größenordnung dabei MHC-Klasse-I-Moleküle mit dem synthetischen Peptid beladen werden können, ist bisher nur wenig untersucht. Einen interessanten Befund lieferten Hahn et al. (1996). Diese Autoren konnten mittels Zytolyse-Assay zeigen, dass eine endogene Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen einer exogenen Beladung mit dem entsprechenden synthetischen Peptid überlegen sein kann. Ob ein ebensolcher Unterschied für das viral kodierte SIINFEKL nachzuweisen ist, sollte abschließend untersucht werden. Gleichzeitig sollte die maximale endogene Beladbarkeit der MHC-Klasse-I-Moleküle mit der exogenen Beladung mit synthetischem Peptid verglichen werden (siehe auch 4.8.4).

Hierzu wurden wiederum IFN γ vorbehandelte C57BL/6 MEF zentrifugal mit mCMV-vRAP oder mCMV- Δ vRAP infiziert. 16h p.i. wurden die Zellen abgelöst und für eine Stunde mit einer log₁₀-Titration synthetischem SIINFEKL-Peptid (10^{-4} M bis 10^{-8} M) inkubiert (siehe 3.6.4.2). Die Quantifizierung der exogen mit SIINFEKL beladenen K^b-Komplexe erfolgte jeweils auf der Oberfläche der m164/gp36,5 positiven bzw. negativen Zellen. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der K^b-Komplexe auf beiden Populationen bestimmt.

Die graphische Auswertung der Quantifizierung (siehe Abb. 45) zeigte, dass die exogene Beladung mit synthetischem Peptid der endogenen Beladung durch die virale Infektion deutlich unterlegen war. Auf mCMV-vRAP infizierten Zellen konnte, selbst mit der extrem unphysiologischen Konzentration von 10^{-4} M, keine Beladung von K^b-Molekülen nachgewiesen werden. Demgegenüber konnten auf mCMV- Δ vRAP infizierten Zellen maximal 1% der K^b-Moleküle an der Oberfläche beladen werden. Nicht infizierte Zellen waren dagegen deutlich besser exogen beladbar. Auf ihnen konnten bis zu ~6% aller K^b-Moleküle mit SIINFEKL beladen werden. Mit abnehmender Peptidkonzentration nahm auch die Zahl der SIINFEKL-beladenen K^b-Komplexe ab. Hierbei konnten nicht-infizierte Zellen in den infizierten Kulturen vergleichbar beladen werden während die Zellen aus nicht-infizierten Kontrollkulturen im Vergleich etwas schlechter zu beladen waren. Insgesamt konnte jedoch festgestellt werden, dass die Effizienz der endogenen Beladung (~7%) durch exogenes Beladen nur bei extrem unphysiologischen Peptidkonzentrationen erreicht werden konnte ($\geq 10^{-5}$ M).

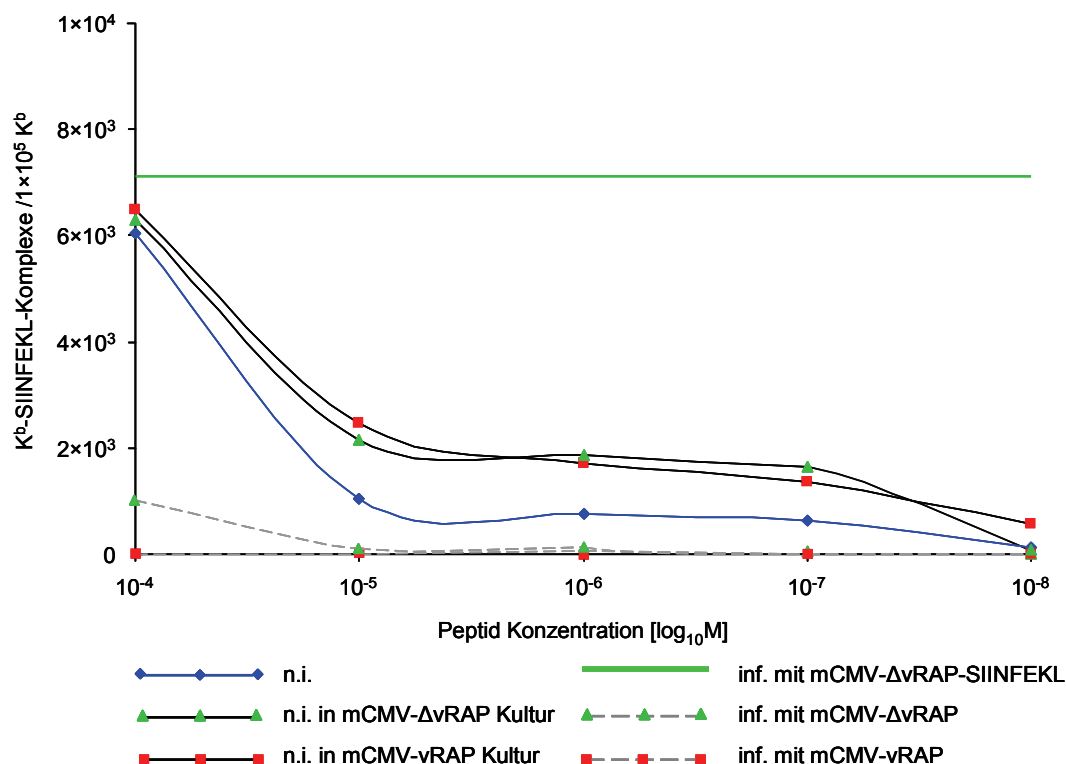


Abb. 45: Quantifizierung der exogenen Beladung von MEF nach mCMV-Infektion

Mit mCMV-vRAP (■) oder mCMV- Δ vRAP (▲) infizierte MEF (zentrifugal, MOI 4, IFN γ vorbehandelt) wurden 16h p.i. für 1h (37°C) mit einer \log_{10} -Titration (10^{-4} M- 10^{-8} M) des synthetischen SIINFEKL-Peptids exogen beladen. Im Anschluss wurden die K^b-SIINFEKL-Komplexe sowie die gesamten K^b-Moleküle an der Oberfläche gefärbt und die infizierten Zellen mittels des Nachweises von 164/gp36,5 markiert. In der Quantifizierung wurden m164/gp36,5-positive (—) und m164/gp36,5 negative (---) Fraktionen separat analysiert. Als Kontrolle dienten identisch behandelte nicht infizierte MEF (—). Die Abtragung der jeweils auf 1×10^5 K^b-Moleküle normierten Zahl von SIINFEKL-K^b-Komplexen erfolgte gegen die entsprechende Peptid-Konzentration. Die Auswertung erfolgte analog 4.7.5.2.

Zusammenfassung: Eine zytofluorometrisch Quantifizierung von Zelloberflächenantigenen wurde mit Hilfe des QIFIKIT realisiert. Mit dieser Methode gelang eine absolute Quantifizierung des Einflusses der vRAPs von mCMV auf die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I K^b-Moleküle. Dabei zeigte sich, dass die vRAPs deren Expression um einen Faktor 4 reduzieren. Demgegenüber zeigte die Quantifizierung der SIINFEKL Präsentation, dass die Deletion der vRAPs eine Verstärkung der Expression um mindestens das um mindestens das Zehnfache (ca. 13× in den dargestellten Experimenten) bewirkt. Interessanterweise erwies sich die endogene Beladung gegenüber einer exogenen Beladung mit synthetischem Peptid als deutlich überlegen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Infektion mit HCMV ist in Patienten mit defizientem Immunsystem von hoher klinischer Relevanz, da sie zu lebensbedrohenden Erkrankungen führen kann. Zur Entwicklung einer Vakzine oder einer routinemäßig anwendbaren Zytoimmuntherapie ist das genaue Verständnis der Erreger-Wirts-Beziehung von erheblicher Bedeutung. Da die Immunkontrolle der CMV-Infektion vorrangig von virusspezifischen CD8 T-Zellen vermittelt wird, war in der letzten Dekade insbesondere die Interferenz von HCMV (Lilley & Ploegh, 2007; Lin et al., 2007) bzw. mCMV (del Val et al., 1989; Reddehase et al., 2004; Pinto & Hill, 2005; Böhm et al., 2008) mit dem MHC-Klasse-I-Weg der Antigenpräsentation ein Schwerpunkt der Forschung. So konnten im murinen Modellsystem die drei mCMV Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 identifiziert werden, die während der Infektion mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Komplexen interagieren und dadurch die Präsentation von viralen Peptiden an der Zelloberfläche verhindern (Hengel et al., 1999). Diese drei Genprodukte werden als vRAPs (*viral regulators of antigen presentation*) (Reddehase, 2002; Holtappels et al., 2006a) oder VIPRs (*viral gene products that interfere with antigen presentation*) (Pinto & Hill, 2005) zusammengefasst und sind durch verschiedene mCMV-Deletionsmutanten der Analyse zugänglich gemacht worden (Wagner et al., 2002). Frühere Untersuchungen der biologischen Funktion der vRAPs zeigten, dass eine Deletion der vRAPs sowohl in BALB/c- als auch in C57BL/6-Mäusen nur geringen Einfluss auf das mCMV-spezifische CD8 T Zell-*Priming* hat (Doom and Hill, 2008). Demgegenüber lassen neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe erkennen, dass das regionale *Priming* im Lymphknoten von den vRAPs beeinflusst wird (Böhm et al., 2008).

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, weiter zum Verständnis des Einflusses der mCMV-vRAPs auf die MHC-Klasse-I-Präsentation beizutragen. Dabei sollten insbesondere Effizienz und Spezifität der viralen Immunevasion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden mCMV-Rekombinanten generiert, die es ermöglichen, spezifisch ein viral-kodiertes, antigenes Peptid auf der Oberfläche infizierter Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren.

Integration des Reporter-Peptids SIINFEKL mittels orthotopen Peptid-Austausches in mCMV-Rekombinanten

Die Mehrheit der Untersuchungen der vRAP vermittelten Immunevasion beruht auf indirekten Verfahren. Die Schwierigkeit, direkt den Einfluss der vRAPs auf die Präsentation viral beladener MHC-Klasse-I-Komplexe zu verfolgen, liegt in deren Nachweis. Für viele Untersuchungen stehen radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte synthetische Peptide zu Verfügung, die nach exogener Beladung nachgewiesen werden können. Allerdings ist es sehr schwierig, selektiv ein virales Peptid während der Infektion zu markieren und anschließend dessen Präsentation in MHC-Klasse-I-Komplexen nachzuweisen.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf das H2-K^b restringierte Modellpeptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) zurückgegriffen. Der Präsentationskomplex aus SIINFEKL und dem MHC-Klasse-I-Molekül K^b kann durch den TCR imitierenden, monoklonalen Antikörper T-AG 25.D1.16 (Porgador et al., 1997) erkannt und nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die Integration von SIINFEKL in das mCMV-Genom erstmals ein Nachweissystem der mCMV Peptidpräsentation etabliert werden. Zudem ermöglicht die endogene Präsentation von SIINFEKL, auf das große Repertoire der SIINFEKL-basierten Techniken, wie beispielsweise die monoklonale T-Zelllinie OT-1 (Kelly et al., 1993) oder die von ihr abgeleitete transgene OT-1 Maus (Hogquist et al., 1994), zurückgreifen zu können.

Für die erfolgreiche Präsentation eines antigenen Peptids auf der Oberfläche einer Zelle ist die Prozessierung im Proteasom, der Transport über den TAP-Komplex in das ER-Lumen sowie die Stabilisierung des MHC-Klasse-I-Komplexes durch die Peptid-Bindung notwendig (Rock et al., 2004). Während die Bindung an den TAP-Komplex und das leere MHC-Klasse-I-Molekül vorrangig vom antigenen Peptid bzw. einem N-terminal verlängerten Vorläufer determiniert werden, wird die proteasomale Prozessierung stark von der Peptidumgebung bestimmt, so dass die Wahl des Peptid-Integrationsortes entscheidend für den Erfolg der Peptidpräsentation ist.

In dieser Arbeit wurde für die Integration von SIINFEKL der ORF *m164* an der Position des H2-D^d restringierten immundominanten Peptids m164₁₅₀₋₁₅₈ (Holtappels et al., 2002a; Däubner, 2007) gewählt. Diese Position im mCMV-Genom bietet den Vorteil, ein nicht-essentiell virales Protein als Träger zu nutzen, das allerdings das Potential besitzt, ein immundominantes Peptid zu präsentieren. Der Austausch von m164₁₅₀₋₁₅₈ gegen SIINFEKL wird als orthotop bezeichnet, da es sich um die Integration an eine ursprünglich Peptid-tragende Position handelt. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass innerhalb

des viralen Genoms nur die geringst mögliche Änderung erfolgt und die virale Replikation durch die Mutagenese nicht beeinflusst wird.

Neben dem funktionellen Peptid SIINFEKL konnte auch das Peptid SIINFEKA (OVA₂₅₇₋₂₆₄ L→A) auf identische Weise integriert werden. In diesem Peptid ist die Anker-aminosäure Leucin₂₆₄ gegen ein Alanin ausgetauscht. Dieser Austausch hat zum einen zur Folge, dass die Bindung des antigenen Peptids in der Bindungstasche des MHC-Moleküls verschlechtert wird. Durch den Austausch der großen Isopropylgruppe des Leucins gegen die kleine Methylgruppe des Alanins können nicht mehr alle zur Stabilisierung des Komplexes notwendigen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden (siehe Abb. 5), so dass der MHC-Peptid-Komplex instabil wird. Zum Anderen ist die proteasomale Schnitteffizienz am Schnitt Alanin / Phenylalanin im Vergleich zum Paar Leucin / Phenylalanin deutlich reduziert (Toes et al., 2001; Tenzer et al., 2005). Beides zusammen verhindert die Antigenpräsentation. Der Erfolg dieser Strategie konnte für einen identischen Aminosäure-Austausch (L→A) im antigenen Peptid IE1₁₆₈₋₁₇₆L→A gezeigt werden (Simon et al., 2006).

Die Herstellung von mCMV-Rekombinanten mit dem orthotopen Austausch m164₁₅₀₋₁₅₈→SIINFEKL erfolgte im Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren des BAC-Systems (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; 2004b; Wagner et al., 1999; 2006). Die für die Rekombination benötigten viralen DNA-Sequenzen waren bereits im Plasmid pBlue_m164ausC3X (Holtappels et al., 2008) vorhanden und konnten leicht in die zu generierenden Shuttle-Vektoren pST76K_m164-SIINFEKL und pST76K_m164-SIINFEKA kloniert werden.

Der erfolgreiche orthotope Austausch innerhalb des mCMV-Genoms resultiert aus der homologen Rekombination mit dem in einem BAC-Vektor klonierten mCMV-Genom nach Transformation eines der Shuttle-Plasmide. Zur Untersuchung des Einflusses der vRAPs wurden zwei unterschiedliche BAC-Vektoren eingesetzt. Dies waren der Vektor C3X (Wagner et al., 1999), der für das mCMV-WT-Genom kodiert, und der Vektor mCMV-BAC-Δm06/Δm152 (Wagner et al., 2002), der für eine vRAP-Deletionsmutante kodiert. Nach abschließender Transfektion der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide und ihrer Rekonstitution in permissive Zellen konnten die entsprechenden Viren aus Zellkulturüberstand isoliert und aufgereinigt werden.

Insgesamt konnten erfolgreich vier mCMV-Rekombinanten generiert werden: Die Rekombinanten mCMV-m164-SIINFEKL (mCMV-vRAP-SIINFEKL) und mCMV-m164-SIINFEKA (mCMV-vRAP-SIINFEKA) kodieren für alle drei vRAPs, die Rekombinanten mCMV-Δm06/Δm152-m164-SIINFEKL (mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL) und mCMV-Δm06/

Δ m152-m164-SIINFEKA (mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA) hingegen nur für das vRAP m04. Da für die solitäre Expression des verbliebenen m04/gp34 bisher weder eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation (Wagner et al., 2002), noch eine Behinderung der Erkennung der Präsentationskomplexe beschrieben wurde (Holtappels et al., 2006a), war es für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien nicht notwendig auch den ORF *m04* zu deletieren.

Der orthotope Peptid-Austausch zeigt keinen Einfluss auf den viralen Infektionszyklus

Das Ziel dieser Arbeit war es, mCMV-Rekombinanten zu generieren, die den Nachweis der Präsentation eines viral kodierten Reporter-Peptids auf MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche ermöglichen. Dabei sollte der orthotope Peptid-Austausch die biologischen Eigenschaften der Viren mit Ausnahme eines veränderten Immunoms möglichst wenig beeinflussen. Um eine möglichst konservative Mutagenese des viralen Genoms zu ermöglichen wurde gezielt die Methode des orthotopen Peptid-Austauschs und nicht die Integration einer längeren Proteinsequenz oder des vollständigen Ovalbumins gewählt. Trotzdem können Veränderungen der biologischen Eigenschaften des Trägerproteins m164/gp36,5 und daraus folgend der viralen Replikation durch den orthotopen Peptid-Austausch nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur wird dem Trägerprotein allerdings keine bekannte Funktion zugeordnet; nach Deletion wird es als nicht-essentiell in Zellkultur und *in vivo* (J. Müller, Diplomarbeit) beschrieben, so dass nur die Expression und intrazelluläre Lokalisation abgefragt werden konnten. Dabei zeigt sich, dass trotz orthotoper Insertion an Position m164₁₅₀₋₁₅₈ das Protein weiterhin ab 3h im ER nachgewiesen werden konnte. Somit konnte der gewählte Integrationsort dazu genutzt werden, ein Fremdpeptid zur Expression zu bringen.

Die Replikationsstudien von mCMV-vRAP-SIINFEKL, mCMV-vRAP-SIINFEKA, mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA und mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL durch Bestimmung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse zeigte, dass sie im Vergleich zu ihren Ursprungsviren (mCMV-vRAP und mCMV- Δ vRAP) eine ähnliche Zahl an viralen Genomen benötigen, um ein Plaque-bildendes Ereignis auszulösen. Die in dieser Arbeit mittels hochspezifischer quantitativer PCR ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse lagen mit 100:1 bis 500:1 sowohl in der Größenordnung der jeweiligen Ursprungsviren, als auch im Bereich des veröffentlichten Genom-zu-PFU-Verhältnis des WT-mCMV (*Strain* Smith) von 500:1 (Kurz et al., 1997; Grzimek et al., 1999; Böhm et al., 2008). Alle Rekombinanten replizieren folglich in permissiven Fibroblasten mit einer vergleichbaren Effizienz.

Gleichfalls zeigte sich auch die *in vivo* Replikation der mCMV-Rekombinanten in immunsupprimierten C57BL/6-Mäusen von der SIINFEKL-Integration unbeeinflusst. mCMV-vRAP-SIINFEKL repliziert in allen getesteten Organen (Leber, Milz und Lunge) mit vergleichbarer Effizienz wie mCMV-vRAP. In einer aktuellen Studie unsere Arbeitsgruppe mit allen in dieser Arbeit generierten mCMV-Rekombinanten ließ sich dieses auch für die Infektion von BALBC/J-Mäusen verifizieren. Hierbei zeigte sich für die Replikation in Leber, Milz, Lunge und Speicheldrüsen keinerlei Attenuierung.

Bestätigung der *in vivo* Immunogenität des orthotop integrierten SIINFEKL

Die Integration eines T-Zell-Antigens durch orthotopen Peptid-Austausch ist eine bisher nicht verwendete Technik, die es ermöglicht, antigene Peptide zur Präsentation zu bringen. In den meisten Fällen werden dagegen größere Fragmente oder ganze Proteine zur Expression gebracht, da solch ein Vorgehen ein unverändertes proteolytisches Schnittstellenmuster im Proteasom gewährleistet. Durch die Veränderung der Proteinsequenz kann dies jedoch unter Umständen zu einer artifiziellen Expression des Proteins und einer Veränderung der Proteinstruktur und Stabilität führen und dadurch die Effizienz der Prozessierung in unkontrollierbarer Weise beeinflussen. Zum Nachweis des Erfolgs des orthotopen Austausches wurde die Immunogenität der SIINFEKL-kodierenden Rekombinanten im ELISpot-Assay getestet. Dabei konnten in infizierten C57BL/6-Mäusen SIINFEKL-spezifische CD8 T-Zellen sowohl während der Akut- als auch während der Memory-Phase der Infektion nachgewiesen werden. Der gleichzeitige Nachweis ausgewählter H-2^b restringierter mCMV-Spezifitäten ermöglichte die Einordnung der integrierten Spezifität in das mCMV-Immunom sowie eine Verfolgung möglicher Veränderungen in der absoluten und relativen Repräsentanz der Spezifitäten im Verlauf der Infektion.

Die in das mCMV-Immunom neu aufgenommene Spezifität gliedert sich während der Infektion in das Spektrum der mCMV-Spezifitäten ein (Munks et al., 2006a; b). Der erfolgreiche Nachweis von SIINFEKL-spezifischen CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-vRAP-SIINFEKL und mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL zeigte, dass der orthotope Peptidaustausch zur funktionellen *in vivo* Präsentation des SIINFEKL-Peptids führt und sich Prozessierung und Präsentation des Epitops nicht von denen eines authentischen mCMV-Peptids unterscheiden.

Für das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) oder das Maus Hepatitis Virus (MHV) sind Verschiebungen innerhalb der Hierarchie der immundominanten Spezifitäten zwischen Akut- und Memory-Phase der Infektion beschrieben worden (Van der Most et al., 1996; Bergmann et al., 1999). Selbiges konnte auch für die Infektion mit mCMV ge-

zeigt worden (Munks et al., 2007; Holtappels et al., 2008). Da durch die Integration von SIINFEKL das mCMV-Immunom der C57BL/6-Maus verändert wurde, war es notwendig, die Zusammensetzung der T-Zell-Spezifitäten im zeitlichen Verlauf der Infektion zu verfolgen. Dies ist insofern von Interesse, da Yewdell und Bennink (1999) postulierten, dass die Stellung eines Epitops innerhalb der Hierarchie von den anderen Spezifitäten beeinflusst wird. Für ein Peptid des Nukleoproteins von LCMV (Van der Most et al., 2003) sowie für die CD8 Antwort gegen SIV (Mothe et al., 2002) konnte solch eine Veränderung auch tatsächlich gezeigt werden. In den in dieser Arbeit gezeigten Versuch zeigte sich dem die Epitop-Hierarchie der Immunantwort gegen mCMV während des longitudinalen Verlaufs der Infektion als sehr stabil, da sie trotz Integration von SIINFEKL keine grundlegenden Änderung beobachtet wurden.

Allerdings ist festzustellen, dass die m164₁₆₀₋₁₆₈-Spezifität unter der Integration von SIINFEKL sowohl in der Akut- als auch während der Memory-Phase der Infektion reduziert vorliegt. Interessanterweise befindet sich dieses K^b-restingierte Peptid, nur durch eine Aminosäure getrennt, C-terminal zum Integrationsort von SIINFEKL. Diese enge räumliche Lokalisierung beider Peptide lässt vermuten, dass durch Integration von SIINFEKL die proteasomale Prozessierung des Peptids m164₁₆₀₋₁₆₈ verändert wird. Einen Hinweis darauf, dass ein verändertes Schnittverhalten bei der Prozessierung vorliegt, liefert das Programm *mhc-pathway.net* (Tenzer et al., 2005). Dieses berechnet für SIINFEKL einen deutlich besseren *Proteasome-Score* als für das Peptid m164₁₆₀₋₁₆₈. Somit liegt der Schluss nahe, dass durch den orthotopen Peptidaustausch die Wahrscheinlichkeit der proteasomalen Prozessierung in Richtung SIINFEKL verschoben wird und dadurch die Zahl der N-terminal verlängerten Vorläuferpeptide der m164₁₆₀₋₁₆₈-Spezifität reduziert ist. Zusätzlich kann durch die Integration die Sequenz der Vorläuferpeptide so verändert sein, dass die post-proteasomale Prozessierung beeinflusst wird und damit nur ein deutlich niedrigerer Anteil an reifem Peptid für die Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen zu Verfügung steht. Der Nachweis einer veränderten Zusammensetzung der proteasomalen Schnittprodukte könnte nachfolgend mittels Massenspektroskopie erfolgen (Cascio et al., 2001) und evtl. weitere Hinweise auf die gegenseitige Beeinflussung beider Spezifitäten liefern.

Präsentation von SIINFEKL-K^b Komplexen auf infizierten Zellen und ihre Beeinflussung durch die vRAPs

Wie vorangehend beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl mCMV-vRAP-SIINFEKL als auch mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL erfolgreich SIINFEKL- und mCMV-spezifische CD8 T-Zellen primen können. Damit konnte der von Gold et al. (2004) gezeigte Phänotyp eines von vRAPs unbeeinflussten CD8 T Zell-*Primings* auch für SIINFEKL bestätigt werden. Dieser Befund liegt wahrscheinlich im sogenannten *Cross-Priming* (Bevan, 1976; 2006) begründet. Dabei nehmen nicht infizierte APCs Material infizierter Zellen auf. Dieses Material wird anschließend prozessiert und die generierten antigenen Peptide in den MHC-Klasse-I-*Pathway* der Antigenpräsentierung eingeschleust (Shen & Rock, 2006; Burgdorf & Kurts, 2008). Die so an der Zelloberfläche der APC präsentierten viralen Peptide induzieren abschließend die antivirale CD8 T Zell-Antwort. Da für mCMV gezeigt werden konnte, dass die vRAPs in DCs das direkte CD8 T Zell-*Priming* effektiv blockieren (Munks et al., 2007), muss davon ausgegangen werden, dass nach Expression der vRAPs während der Infektion ein Großteil des mCMV-spezifischen CD8 T Zell-*Primings* über *Cross-Priming* erfolgt (Arrode and Davrinche, 2003 ; Böhm et al., 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch die Präsentation des orthotop integrierten Peptids SIINFEKL von den vRAPs kontrolliert wird. Hierfür wurde die Erkennung von SIINFEKL-K^b-Komplexen nach Infektion sowohl im ELISpot-Assay als auch im Zytolyse-Assay mit Hilfe einer SIINFEKL-spezifischen CTLL getestet. Dabei war festzustellen, dass die Präsentation von SIINFEKL ebenso von vRAPs abhängig ist wie die Präsentation der viralen Peptide (Holtappels et al., 2006a). Bemerkenswert ist allerdings, dass SIINFEKL nicht wie das ursprünglich an dieser Position lokalisierte Peptid m164₁₅₀₋₁₅₈ der Kontrolle der vRAPs entkommt (Holtappels et al., 2002a), sondern ihr unterliegt. Allerdings sind die beiden Peptide nicht direkt miteinander vergleichbar, da sie neben einer unterschiedlichen Länge – m164₁₅₀₋₁₅₈ ist ein 9mer, SIINFEKL hingegen ein 8mer – auch eine unterschiedliche MHC Restriktion aufweisen (H-2^b-SIINFEKL gegenüber H-2^d-m164₁₅₀₋₁₅₈). Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Prozessierung und TAP-Transport beider Peptide unterscheiden. Hierzu ist zu bemerken, dass SIINFEKL nur vom Proteasom prozessiert wird (Cascio et al., 2001). Die Prozessierung von m164₁₅₀₋₁₅₈ ist bisher nicht untersucht worden.

Dass die Regulation der SIINFEKL-Präsentation vergleichbar zur Regulation der Präsentation viraler Peptide ist, ergab sich aus dem Befund, dass *in vitro* die immunevasive Wirkung der vRAPs auf SIINFEKL durch IFN γ Vorbehandlung aufgehoben wird. Diese

Aufhebung der Immunevasion ist für virale Peptide schon seit längerer Zeit beschrieben (Hengel et al., 1994; Khan et al., 2004) und mehrfach verifiziert worden (Holtappels et al., 2006a). Die genaue Wirkweise der IFN γ -vermittelten Wiederherstellung der MHC-Klasse-I-Expression viraler Antigene ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings ist bekannt, dass IFN γ als zentraler Regulator der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation in Erscheinung tritt (Früh & Yang, 1999). IFN γ sorgt über die vermehrte Bildung von Immunoproteasomen nach Induktion der Synthese von u. a. LMP2 und LMP7 für die Ausweitung des Pools an präsentierten Peptiden (Strehl et al., 2005). Zusätzlich vermittelt es durch Erhöhung der Expression von TAP (Abele & Tampé, 2006) und von MHC-Klasse-I-Proteinen (Korber et al., 1987) die vermehrte Oberflächenpräsentation antigener Peptide. Insbesondere die vermehrte Synthese von MHC-Klasse-I kann für eine Überwindung der immunevasiven Wirkung der vRAPs sorgen. Da durch die erhöhte Anzahl von Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen nicht mehr alle von den vRAPs beeinflusst werden, kann eine für die Erkennung der infizierten Zelle durch CD8 T-Zellen ausreichende Anzahl die Zelloberfläche erreichen..

Wie bereits mehrfach beschrieben, bedient sich die Mehrheit der klassischen immunologischen Analysen von präsentierten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen eines indirekten Nachweises durch Messung der T-Zell-Effektorfunktion, z. B. im Zytolyse- oder im ELISpot-Assay. Nur wenige Techniken ermöglichen den direkten Nachweis der Präsentations-Komplexe auf der Zelloberfläche. Die am besten etablierten Verfahren basieren auf TCR-imitierenden Antikörpern (Porgador et al., 1997; Cohen et al., 2003a; b), die spezifisch einen definierten Peptid-MHC-Komplex erkennen. Diese Antikörper ermöglichen die direkte Analyse der Antigenpräsentation in der Immunfluoreszenz und der Zytolumetrie. Der klassische Vertreter dieser Antikörperklasse ist der für den SIINFEKL-K^b-Komplex spezifische mAb T-AD 25-D1.16 (Porgador et al., 1997). Mit diesem ließ sich in der hier vorliegenden Arbeit die Präsentation von SIINFEKL nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL spezifisch auf IFN γ vorbehandelten, infizierten MEF mittels Zytolumetrie nachweisen.

Der große Vorteil T-Zell basierter Assays liegt im Nachweis physiologischer Mengen von Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Molekülen, nämlich von ~1-5 Komplexen. Demgegenüber benötigen Antikörper-basierte Methoden deutlich höhere Antigendichten an der Zelloberfläche, da sie, methodisch bedingt, eine niedrigere Sensitivität aufweisen. Da aber gleichzeitig die Sättigung in Antikörper-gestützten Methoden deutlich später eintritt, können auch hohe Antigendichten sicher nachgewiesen und quantifiziert werden (Chefalo & Harding, 2001). Dieser Sensitivitätsunterschied beider Methoden ist klar in den Ergebnissen dieser Arbeit zu erkennen. Während im Zytolysetest und im *ELISpot*-Assay mit Hilfe

einer SIINFEKL-spezifischen CTLL die Präsentation von SIINFEKL auf C57BL/6 MEF nach Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL nachweisbar war, war für den Nachweis des SIINFEKL-K^b Präsentationskomplexes durch den mAb T-AD 25-D1.16 das Zusammenspiel von IFN γ -Vorbehandlung und Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL notwendig.

Quantifizierung der zellulären Proteindegradation und Antigenpräsentation

In nicht infizierten Zellen repräsentieren die MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche eine Momentaufnahme der aktuellen Proteindegradation in der Zelle. Dabei werden vorrangig niederaffine *Self-Peptides* in geringer Antigendichte präsentiert, so dass CD8 T-Zellen nicht aktiviert werden. Im Gegensatz dazu werden während einer Virusinfektion im ER vom Peptid-Loading-Komplex bevorzugt hochaffine, virale Peptide auf leere MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und im Anschluss an der Zelloberfläche präsentiert. Dabei determinieren die Zahl der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe und die Halbwertszeit der Bindung der Komplexe an den entsprechenden TCR die Aktivierung der T-Zelle (González et al., 2005; Carreño et al., 2006). Somit ist die Modulation der Antigenpräsentation ein entscheidender Regulator der viralen Immunevasion. Im Gegensatz zur qualitativen Analyse der Regulation (u. a. Wagner et al., 2002) lässt jedoch nur die quantitative Analyse, wie in dieser Arbeit für die mCMV-Immunevasion dargelegt, Aussagen zur Dynamik und Effizienz der zellulären Ereignisse zu (Stevanovic & Schild, 1999; Yewdell, 2001; Lehner, 2003). Deshalb sind quantitative Studien notwendiger Bestandteil von Untersuchungen zur Immunmodulation.

Um die Effizienz einer immunevasiven Strategie auf zellulärer Ebene beurteilen zu können, sind zunächst die zur Aktivierung einer CD8 T-Zelle erforderliche Anzahl von Präsentations-Komplexen sowie die Gesamtzahl von MHC-Klasse-I-Molekülen, die ein bestimmtes Peptid präsentieren, zu analysieren. Hierbei zeigte sich, dass schon ≤ 10 Komplexe ausreichend sind, um eine T-Zelle zu aktivieren (Brower et al, 1994; Sykulev et al, 1994; 1996). Dies wird dadurch erklärt, dass ein einzelner MHC-Peptid-Komplex bis zu 200 TCRs nacheinander binden kann (Valitutti et al, 1995) und sich die einzelnen Signale summieren. Dies führt zu einer Verstärkung, so dass die T-Zelle aktiviert wird (Carreño et al., 2006). Trotzdem zeigte es sich, dass die Erhöhung der Antigendichte auf der Zelloberfläche eine verbesserte T-Zell-Antwort zur Folge hat (Brower et al, 1994; Valitutti et al, 1995). Dies folgt direkt aus dem Zusammenspiel zwischen der Antigendichte an der Zelloberfläche der APC und der Aviditätsverteilung der verschiedenen TCRs einer T-Zell-Populationen. Quantitative Messungen von zellulär prozessierten und präsentierten Peptiden erfolgten bisher mittels biochemischer Methoden und zeigten, dass von einer APC

zwischen 10^2 und 10^4 Kopien eines Peptids präsentiert werden (Stevanovic & Schild, 1999).

Eine bemerkenswerte, zusammenfassende quantitative Analyse der Prozessierung und Präsentation antigener Peptide lieferten Princiotta et al. (2003). In dieser Arbeit wurde der komplexe Ablauf der Antigenpräsentation in stromalen Zellen und professionellen APCs an Hand des Modellpeptids SIINFEKL quantitativ analysiert. Dabei zeigte sich, dass jedes der $\sim 8 \times 10^5$ Proteasome der Zelle $\sim 2,5$ Substrate pro min degradiert. Für die anschließende Präsentation eines Peptids auf einem der $\sim 2 \times 10^5$ MHC-Klasse-I-Moleküle der Zelloberfläche müssen ~ 500 - 3000 Substrate degradiert werden, was letztendlich zu einer Präsentation von 2×10^3 bis 1×10^4 Peptiden pro Zelle führt. Ob eine vergleichbare Präsentation von SIINFEKL nach orthotoper Expression während der mCMV-Infektion nachweisbar ist und wie sich die vRAP-vermittelte Immunevasion auf eine mögliche Präsentation auswirkt wurde im Verlauf dieser Arbeit untersucht.

Quantifizierung der mCMV-Antigenpräsentation und -Immunevasion

Alle quantitativen Untersuchungen der mCMV-Immunevasion wurden mit murinen Fibroblasten, die aus C57BL/6-Mäusen isoliert wurden, durchgeführt. Fibroblasten sind im Organismus keine professionellen APCs, sie sind vielmehr klassische Zielzellen der mCMV-Infektion und der anschließenden Erkennung durch CD8 T-Zellen. Aus Zellkultur-Experimenten ist bekannt, dass die vRAPs die MHC-Klasse-I-Moleküle auf infizierten Fibroblasten effektiv regulieren (Wagner et al., 2002) und dadurch die Erkennung von präsentiertem Peptid durch CD8 T-Zellen verhindern (Holtappels et al., 2006a).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine IFN γ -Vorbehandlung nicht infizierter Fibroblasten zur deutlichen Erhöhung der MHC-Klasse-I-Expression führt. So konnten auf diesen Zellen $\sim 3 \times 10^5$ K^b-Moleküle nachgewiesen werden – ein Wert der in der Literatur bisher nur für professionelle APCs beschrieben wurde (Christinck et al., 1991; Falk et al., 1991a; b; Stevanovic & Schild, 1999). Nach Infektion reduziert die Expression der vRAPs die Expression von K^b auf der Zelloberfläche um etwa 90%. Auf einer infizierten Zelle, die keine vRAPs exprimiert, erhöht sich diese Zahl auf $\sim 1,5 \times 10^5$ K^b-Moleküle. Noch deutlicher ließ sich der Einfluss der vRAPs auf im Zuge der Infektion endogen beladene SIINFEKL-K^b-Komplexe nachweisen. Die Quantifizierung von SIINFEKL-präsentierenden K^b-Moleküle zeigt eine von den vRAPs vermittelte Reduktion von etwa 1×10^4 Komplexen auf einen Wert, der unterhalb des Detektions-Limits des Assays ($\leq 2 \times 10^3$ Komplexe) liegt. Dies bedeutet eine Reduktion um eine Faktor Hundert vom Ausgangswert. Diese Zahlen machen sehr deutlich, wie effektiv die vRAPs den MHC-

Klasse-I-Weg beeinflussen. So ist davon auszugehen, dass die vRAPs für eine fast vollständige Umleitung des intrazellulären Transports der Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Komplexe sorgen.

Aus dem Vergleich des Einflusses der vRAPs auf die Gesamt-Population der MHC-Moleküle an der Zelloberfläche mit demjenigen auf die mit SIINFEKL beladene Teilpopulation kann gefolgert werden, dass letztere stärker der Regulation der vRAPs unterliegt. Aus biochemischen und zellbiologischen Studien der Funktionen der einzelnen vRAPs ist bekannt, dass die vRAPs direkt regulatorisch auf den MHC-Klasse-I-Transportweg wirken. Dies zeigte sich insbesondere für m152/gp40, das nach solitärer Expression transient an die Komplexe bindet und deren Retention im ERGIC vermittelt (Ziegler et al., 1997; 2000). Dieser Befund lässt eine direkte Virus-spezifische Regulation von bereits auf der Zelloberfläche lokalisierten MHC-Klasse-I Molekülen vernachlässigbar erscheinen. Eher ist es wahrscheinlich, dass während einer Infektion der Großteil der neu beladenen Komplexe von hochaffinen viralen Peptiden besetzt wird. Nur diese frisch beladenen Komplexe unterliegen der Regulation durch die vRAPs. Die bereits vor Expression der vRAPs beladenen Komplexe außerhalb des ERGIC können nicht von den vRAPs gebunden werden und werden somit nach vesikulärem Transport an der Zelloberfläche präsentiert. Im Verlauf der Infektion verarmt allerdings die Zelloberfläche zusehends an MHC-Klasse-I-Molekülen, da diese im Rahmen ihres Recyclings über verschiedene Clathrin-abhängige und -unabhängige Wege internalisiert werden (Naslavsky et al., 2003; 2004), und gleichzeitig der Nachschub durch die vRAPs blockiert ist.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass sich durch Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL die Zusammensetzung der präsentierten antigenen Peptide im Vergleich zu einer nicht infizierten Zelle stark verändert.. So besetzt das viral kodierte Modellpeptid SIINFEKL nach Infektion bis zu 11,7% (Durchschnitt 6,7%) aller an der Oberfläche lokalisierten K^b-Moleküle. Eine derart hohe Antigendichte ist in der Literatur bisher nur für wenige Peptide beschrieben worden. Über biochemische Methoden konnte ein aus dem VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus)-Nukleoprotein stammendes Peptid mit ähnlicher Antigen-Dichte isoliert werden (Van Bleek et al., 1990). Auch das klassische Peptid SYFPEITHI zeigt eine vergleichbare Antigendichte (Falk et al., 1991a). Allerdings sind für die meisten analysierten Peptide deutlich niedrigere Dichten im Bereich zwischen 3% und $\leq 0,1\%$ (bezogen auf 1×10^5 MHC-Klasse-I-Komplexe) beschrieben worden (Stevanovic & Schild, 1999). Da diese Werte allerdings ausschließlich durch biochemische Quantifizierung Säure-extrahierter Peptide gewonnen wurden, geben die Zahlen wegen der damit

verbundenen methodischen Beschränkungen nur Untergrenzen an, so dass anzunehmen ist, dass die tatsächliche Antigendichte höher ist.

Interessanterweise ist die von Rötzschke et al. (1991) nachgewiesene Anzahl an SIINFEKL- K^b -Komplexen auf der Oberfläche von OVA-transfizierten EL4-Zellen mit 88 SIINFEKL-beladenen Molekülen (bezogen auf 10^5 K^b -Moleküle, entsprechend 0,088%) besonders niedrig. Dieser extremen Diskrepanz von ~ 2 log-Stufen zwischen den hier bestimmten Werten und den Literaturwerten liegen wahrscheinlich methodische Unterschiede zu Grunde. So wurde in dieser Arbeit ein virales Expressionssystem verwendet und die Präsentation von SIINFEKL mit IFN γ verstärkt. Während ersteres durch die lange Halbwertszeit der SIINFEKL- K^b -Komplexe (Chefalo & Harding, 2001) bei gleichzeitiger starker Expression des Trägerproteins zur Ansammlung der Komplexe an der Zelloberfläche führt, sorgt letzteres für eine deutliche Verbesserung der Prozessierung (Cascio et al., 2001) und Präsentation des Peptids (Towne et al., 2007). Ferner verhindert der direkte Nachweis der Präsentation auf der Oberfläche der Zelle einen möglichen Verlust von Peptid während der Aufreinigung und Quantifizierung.

Effizienz der endogene Beladung von K^b -Komplexen im Vergleich zur exogenen Beladung mit synthetischem Peptid

Die Infektion mit mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL führt zur effizienten Präsentation von SIINFEKL auf einer großen Zahl der an der Zelloberfläche nachweisbaren K^b -Moleküle. Demgegenüber ist die exogene Beladung von K^b -Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen mit synthetischem Peptid deutlich ineffizienter, so dass selbst nach Inkubation mit extrem hohen Konzentrationen des Peptids nur eine deutlich geringere Zahl von K^b -SIINFEKL-Komplexen auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Auffällig ist dabei zusätzlich, dass nach exogener Beladung die Anzahl der SIINFEKL- K^b -Komplexe direkt abhängig von der Gesamtzahl der K^b -Moleküle ist, während eine endogene Beladung diese Korrelation nicht zeigt.

Für eine Interpretation dieser Befunde ist es zunächst notwendig, die unterschiedlichen Mechanismen der endogenen und der exogenen Beladung der MHC-Klasse-I-Komplexe näher zu betrachten. Im Verlauf der endogenen Antigenpräsentation werden im ER leere MHC-Klasse-I-Moleküle durch einen Multichaperon-Komplex (*peptide loading complex*; PLC) beladen. Der PLC bildet sich nach Translokation des antigenen Peptids ins ER über Vermittlung von Tapasin (im Menschen) oder nach direkter Bindung des leeren MHC-Klasse-I an den TAP (Maus). Er beinhaltet alle zur Beladung notwendigen Komponenten (Koch & Tampé, 2006). Die Bindung des Peptids in der Peptid-Präsentationsgrube sorgt

im Anschluss für die Stabilisierung des Komplexes. Damit nur Peptid-beladene Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert werden, besteht vor dem Transport noch eine letzte Qualitätskontrolle im ERGIC/Golgi (Garstka et al., 2007). Während im MHC-Klasse-II Weg der Antigen-präsentation Peptidaustausche obligatorische Ereignisse sind, die vom Heterodimer HLA-DM katalysiert werden (Jensen et al., 1999), stellen im MHC-Klasse-I Weg Peptidaustausche die Ausnahme dar. Eine physiologische Rolle spielen sie vorrangig während der TAP-unabhängigen Variante der *cross-presentation*, bei der in einem post-Golgi Kompartiment prozessierte antigene Peptide auf zuvor bereits endogen beladene MHC-Klasse-I-Komplexe unter Verdrängung des ursprünglich gebundenen Peptids „umgeladen“ werden (Chefalo & Harding, 2008; Burgdorf & Kurts, 2008), um anschließend präsentiert zu werden.

Im Falle des exogenen Beladens von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche ist es notwendig, dass es dort zu Peptidaustauschen kommt. Dabei ist der Austausch als Gleichgewichtsreaktion nach dem Massenwirkungsgesetz zu betrachten. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Peptidbindung und -dissoziation unter Einfluss des pH-Werts, der lokalen Konzentration des exogenen Peptids am MHC-Klasse-I-Molekül und den entsprechenden Gleichgewichtskonstanten (K_d) der möglichen MHC-Peptid-Komplexe ein (Chefalo & Harding, 2001). Generell lässt sich sagen, dass ein Austausch niederaffiner (hohe K_d) gegen hochaffine Peptide (niedrige K_d) umso wahrscheinlicher ist, je höher die exogene Peptidkonzentration ist und je mehr MHC-Klasse-I-Moleküle zur Verfügung stehen (Jensen et al., 1999). Sobald durch eine Infektion die Mehrheit der MHC-Klasse-I-Komplexe durch hochaffine virale Peptide besetzt ist, wird es ungleich schwerer, diese Peptide exogen auszutauschen, da das Gleichgewicht kaum mehr in Richtung Dissoziation verschoben werden kann (Ojcus et al., 1993). Im Falle der exogenen Beladung mCMV-infizierter Zellen mit SIINFEKL hat dies zur Folge, dass nur wenige K^b -Moleküle an der Zelloberfläche durch Peptidaustausch neu beladen und dadurch nachweisbar werden.

5.2 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte durch einen orthotopen Peptidaustausch das Modellpeptid SIINFEKL erfolgreich anstelle des m164₁₅₀₋₁₅₈-Peptids in das mCMV-Immunom integriert werden. Während der Infektion verhält sich das SIINFEKL-Peptid vergleichbar einem viralen Peptid, d.h., es wird ähnlich präsentiert und durch die vRAPs des mCMV reguliert. Diese Eigenschaft ermöglicht es, SIINFEKL als Reporter für eine absolute Quantifizierung der viralen Immunevasion zu nutzen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die vRAPs m152/gp40 und m06/gp48 in Kombination die Präsentation der während der Infektion im ER beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle mit hoher Effektivität (>Faktor Hundert) reduzieren. Gleichzeitig wurde deutlich, dass während einer Infektion die endogene Beladung von MHC-Klasse-I im ER wesentlich effektiver verläuft, als ihre exogene Beladung mit synthetischen Peptiden an der Zelloberfläche.

Mit den hier generierten mCMV-Rekombinanten erfolgte bisher nur der Nachweis des „*proof of principle*“ der quantitativen Analyse der mCMV-Immunevasion, da nicht alle sieben möglichen Kombinationen der drei vRAPs abgedeckt werden konnte. Um zuverlässig den Beitrag der einzelnen vRAPs zur Gesamtimmunevasion abschätzen zu können, ist es notwendig – analog zu Wagner et al. (2002) – alle Kombinationen der Immunevasionsmutanten mit SIINFEKL zu markieren und anschließend die Effizienz der Immunevasion zu quantifizieren. Zusätzlich kann die etablierte absolute Quantifizierung der Immunevasion im Rahmen der Mutagenese einzelner Proteindomänen innerhalb der vRAPs eingesetzt werden. Insbesondere kann so quantitativ die Rolle der Adaptorprotein-Bindemotive in m06/gp48 (Reusch et al., 1999; 2002) und m04/gp40 (nicht-publizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe) analysiert werden. Solch differenzielle Analysen der Immunevasion können neben der Aufklärung der Mechanismen der mCMV-Immunevasion auch ein besseres Verständnis über den intrazellulären Transports von Proteinen liefern.

Des Weiteren eröffnen die generierten SIINFEKL-präsentierenden mCMV-Rekombinanten die Anwendung der SIINFEKL-spezifischen Techniken im mCMV-Modell. Ein bereits begonnenes Projekt zur Optimierung der Zytoimmuntherapie der CMV-Infektion basiert auf der Verwendung von SIINFEKL als Reporter-Peptid. Hierbei soll die präklinische Anwendung einer Kombination aus adoptivem Transfer TCR-transgener CD8 T-Zellen (SIINFEKL-spezifische OT-1 Zellen) und gleichzeitiger, therapeutischer Vakzinierung mit SIINFEKL-tragenden, nicht-infektiösen subviralen *Dense Bodies* des HCMV (Pepperl-Klindworth et al., 2006) in der immunsupprimierten C57BL/6 Maus evaluiert werden. Durch die Vakzinierung mit den *Dense Bodies* soll die Expansion der SIINFEKL-spezifischen

schen CD8 T-Zellen stimuliert werden. Abschließend soll die Protektion gegen eine mCMV-Infektion mit den generierten SIINFEKL-Rekombinanten getestet werden.

Eine weitere Anwendung der generierten mCMV-Rekombinanten eröffnet sich im Bereich der biologischen Funktion der vRAPs. So ist bekannt, dass diese, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, die Erkennung infizierter Gewebezellen verhindern, nicht aber die Initiation der CD8 T Zell-Antwort unterdrücken. Um dieses Paradoxon zu erklären, wird vornehmlich ein *Cross-Priming* der T-Zellen über DCs postuliert (Böhm et al., 2008). Bisher ist allerdings der endgültige Nachweis der *Cross-Presentation* von mCMV-Antigenen noch nicht geführt worden.

Ein *in vitro* Modell der *Cross-Presentation* beruht auf der Co-Kultivierung OVA-beladener, γ -bestrahlter Splenozyten der bm1-Maus (H-2^{bm1}) zusammen mit DCs (H-2^b) und CFSE-markierten OT-1-Zellen (Schnorrer et al., 2006). In diesem Modell ist eine Proliferation der OT-1 Zellen nur dann nachweisbar, wenn SIINFEKL über *Cross-Presentation* präsentiert wird. Dies liegt darin begründet, dass bm1-Zellen infolge einer Mutation im K^b-Molekül SIINFEKL nicht präsentieren können (Nikolić-Zugić & Bevan, 1990). Für den Nachweis mCMV-*Cross-Presentation* kämen in einem zu prüfenden Ansatz mCMV-vRAP-SIINFEKL infizierte und γ -bestrahlte bm1-Zellen (z.B. MEF oder BMDCs) zum Einsatz.

Eine weitere interessante Anwendung des SIINFEKL-Systems im mCMV-Modell eröffnet sich daraus, dass eine CMV-Infektion häufig perinatal in der Entwicklungsphase des Neugeborenen erfolgt, in der die zentrale (thymische) immunologische Toleranz gegen Umweltantigene etabliert wird. Wenn dem Körper zu diesem Zeitpunkt durch eine Deletion der vRAPs virale Antigene präsentiert werden, kann dies zur Induktion von Toleranz und damit zum Verlust der Kontrolle über die Infektion führen. Die Expression der vRAPs würde in diesem Modell also der schädlichen Toleranzinduktion vorbeugen und wäre ein weiteres Beispiel für die Adaptation des Virus an seinen Wirt. Nicht zuletzt ließe sich mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen mCMV-Rekombinanten-Paare mCMV-vRAP-SIINFEKL / mCMV-vRAP-SIINFEKA und mCMV- Δ vRAP-SIINFEKL / mCMV- Δ vRAP-SIINFEKA ein möglicher Einfluss der vRAP-Expression auf die Toleranzinduktion im Modell der neonatalen mCMV-Infektion elegant überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

- Abele, R., and R. Tampé.** 2006. Modulation of the antigen transport machinery TAP by friends and enemies. *FEBS Lett.* **580**:1156-1163.
- Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski.** 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wildtype properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* **75**:5692-5696.
- Allan, J. E., and G. R. Shellam.** 1984. Genetic control of murine cytomegalovirus infection: virus titres in resistant and susceptible strains of mice. *Arch. Virol.* **81**:139-150.
- Andersen, P. S., A. Stryhn, B. E. Hansen, L. Fugger, J. Engberg, and S. Buus.** 1996. A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* **93**:1820-1824.
- Arase, H.** 2002. Direct recognition of Cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**:1323-1326.
- Arezi, B., W. Xing, J. A. Sorge, and H. H. Hogrefe.** 2003. Amplification efficiency of thermo stable DNA polymerases. *Anal. Biochem.* **321**:226-235.
- Arrode, G., and C. Davrinche.** 2003. Dendritic cells and HCMV cross-presentation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**:277-294.
- Baas, E. J., H. M. van Santen, M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze, P. J. Peters, and H. L. Ploegh.** 1992. Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes. *J. Exp. Med.* **176**:147-156.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M. J. Reddehase.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.* **67**:5360-5366.
- Bantug, G. R., D. Cekinovic, R. Bradford, T. Koontz, S. Jonjic, and W. J. Britt.** 2008. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J. Immunol.* **181**:2111-2123.
- Bergmann, C. C., J. D. Altman, D. Hinton, and S. A. Stohlman.** 1999. Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8+ T cells during viral persistence in the central nervous system. *J. Immunol.* **163**:3379-3387.
- Bevan, M. J..** 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic Assay. *J. Exp. Med.* **143**:1283-1288.
- Bevan, M. J..** 2006. Cross-priming. *Nat. Immunol.* **7**:363-365.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley.** 1987a. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**:506-512.

- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley.** 1987b. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**:512-518.
- Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest, and B. I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene, and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**:1447-1457.
- Böhm, V., C. O. Simon, J. Podlech, C. K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2008. The Immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feed-back regulation. *J. Virol.* **82**:11637-11650.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity. p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Boppana, S. B., K. B. Fowler, Y. Vaid, G. Hedlund, S. Stagno, W. J. Britt, and R. Pass.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **99**:409-414.
- Boppana, S. B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and C. A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**:93-99.
- Born, W., C. Reardon, and R. O'Brien.** 2006. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:31-38.
- Borst, E. M., I. Crnkovic-Mertens, and M. Messerle.** 2004a. Cloning of beta-herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol. Bio.* **256**:221-239.
- Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**:8320-8329.
- Borst, E. M., G. Pósfai, F. Pogoda, and M. Messerle.** 2004b. Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. p 269-280, *In* S. Zhao, and M. Stodolsky (ed.). *Methods Mol. Biol., Bacterial Artificial Chromosomes*. Vol. 256. Humana Press Totowa, NJ, USA.
- Boyd, L. F., S. Kozlowski, and D. H. Margulies.** 1992. Solution binding of an antigenic peptide to a major histocompatibility complex class I molecule and the role of beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2242-2246.
- Brower, R. C., R. England, T. Takeshita, S. Kozlowski, D. H. Margulies, J. A. Berzofsky, and C. Delisi.** 1994. Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. *Mol. Immunol.* **31**:1285-1293.
- Brown, M. G..** 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**:934-937.

- Brunner, K. T., J. Mael, J. C. Cerottini, and B. Chapuis.** 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody, and by drugs. *Immunology* **14**:181-196.
- Bühler, B., G. M. Keil, F. Weiland, and U. H. Koszinowski.** 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* **64**:1907-1919.
- Bukowski, J. F., and R. M. Welsh.** 1985. Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. *J. Immunol.* **135**:3537-3541.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol.* **52**:119-128
- Burgdorf, S., and C. Kurts.** 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**:89-95.
- Buus, S., S. L. Lauemøller, P. Worning, C. Kesmir, T. Frimurer, S. Corbet, A. Fomsgaard, J. Hilden, A. Holm, and S. Brunak.** 2003. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach. *Tissue Antigens.* **62**:378-384.
- Carreño, L. J., P. A. González, and A. M. Kalergis.** 2006. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology.* **21**:47-64.
- Cascio, P., C. Hilton, A. F. Kisselev, K. L. Rock, and A. L. Goldberg.** 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* **20**:2357-2366.
- Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**:78-83.
- Chang, S.-C., F. Momburg, N. Bhutani, A. L. Goldberg.** 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:17107-17112.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**:1865-1869.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, et al..** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:125-169.
- Chefalo, P. J., and C. V. Harding.** 2001. Processing of exogenous antigens for presentation by class I MHC molecules involves post-Golgi peptide exchange influenced by peptide-MHC complex stability and acidic pH. *J. Immunol.* **167**:1274-1282.

- Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**:10-16.
- Chong, K. T., and C. A. Mims.** 1981. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* **57**:415-419.
- Christinck, E. R., M. A. Luscher, B. H. Barber, and D. B. Williams.** 1991. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature.* **352**:67-70.
- Cobbold, M., N. Khan, B. Pourgheysari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Assenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, P. A. and Moss.** 2005 Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* **202**:379-386.
- Cohen, C. J., G. Denkberg, A. Lev, M. Epel, and Y. Reiter.** 2003a. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *J. Mol. Recognit.* **16**:324-332.
- Cohen, C., J. O. Sarig, Y. Yamano, U. Tomaru, S. Jacobson, and Y. Reiter.** 2003b. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J. Immunol.* **170**:4349-4361.
- Compton, T., R. R. Nepomuceno, and D. M. Nowlin.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**:387-395.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**:834-841.
- Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. van Tendeloo, and Z. N. Berneman.** 2007. Regulatory T cells and human disease. *Clin. Dev. Immunol.* **2007**:89195.
- Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper, and P. A. Wearsch.** 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev.* **207**:145-157.
- Czerkinsky, C., G. Andersson, H. P. Ekre, L. A. Nilsson, L. Klareskog, and O. Uchterslony.** 1988. Reverse ELISPOT Assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **110**:29-36.
- Däubner, T.** 2007. Molekulare Charakterisierung und Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des ORFm164 Genprodukts des murinen Cytomegalovirus. Dissertation Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt a.M.

- Dahle, A. J., K. B. Fowler, J. D. Wright, S. B. Boppana, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 2000. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J. Am. Acad. Audiol.* **11**:283-290.
- Daniels, K. A., G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnell, M. Bennett, and R. M. Welsh.** 2001. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **194**:29-44.
- Davison, A. J..** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **84**:17-28.
- Debes, G. F., M. E. Dahl, A. J. Mahiny, K. Bonhagen, D. J. Campbell, K. Siegmund, K. J. Erb, D. B. Lewis, T. Kamradt, and A. Hamann.** 2006. Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *J Immunol.* **176**:557-566.
- de Maeyer, E., and J. de Maeyer-Guignard.** 1992. Interferon-gamma. *Curr. Opin. Immunol.* **4**:321-326.
- del Val, M., H. Hengel, H. Häcker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* **176**:729-738.
- del Val, M., K. Münch, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* **58**:305-315.
- Dijkmans, R., and A. Billiau.** 1988. Interferon gamma: a master key in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **1**:269-274.
- Doherty, P. C.** 1993. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell.* **75**:607-612.
- Dolan, A..** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**:1301-1312.
- Doom, C. M., and A. B. Hill.** 2008. MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:191-204.
- Dowling J. N., A. R. Saslow, J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1976. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Infect. Dis.* **133**:399-408.
- Drew, W. L..** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **14**:608-615.
- Dumas, A., J. Geelen, W. Maris, and J. van der Noordaa.** 1980. Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA. *J. Gen. Virol.* **47**:233-235.
- Dunkley, M., R. G. Miller, and K. Shortman.** 1974. A modified ⁵¹Cr release assay for cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol. Methods* **6**:39-51.

- Dunn, W., C. Chou, H. Li, R. Hai, D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:14223-14228.
- Eickbush, T. H., and E. N. Moudrianakis.** 1978. The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods, and toroids. *Cell* **13**:295-306.
- Eickmann, M., D. Gickhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis, p.245-264. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Einsele, H., and K. Hamprecht.** 2003. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet*. **362**:1343-1344.
- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Pathol.* **71**:905-918.
- Endr sz, V., K. Buri n, K. Berencsi, Z. Gyulai, L. Kari, H. Horton, D. Virok, C. M ric, S. A. Plotkin, and E. G ncz l.** 2001. Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus. *Vaccine* **19**:3972-3980.
- Epstein, M. A., G. Henle, B. G. Achong, Y. M. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**:761-770.
- Falk, K., O. R ttschke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, and H. G. Rammensee.** 1991a. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* **174**:425-434.
- Falk, K., O. R ttschke, S. Stevanovi , G. Jung, and H. G. Rammensee.** 1991b. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. **351**:290-296.
- Feire, A. L., H. Koss, and T. Compton.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15470-15475.
- Fitzgerald, N. A., J. M. Papadimitriou, and G. R. Shellam.** 1990. Cytomegalovirus-induced pneumonitis and myocarditis in newborn mice. A model for perinatal human cytomegalovirus infection. *Arch. Virol.* **115**:75-88.
- Fraile-Ramos, A., T. N. Kledal, A. Pelchen-Matthews, K. Bowers, T. W. Schwartz, and M. Marsh.** 2001. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol. Biol. Cell* **12**:1737-1749.
- Fremont, D. H., E. A. Stura, M. Matsumura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson.** 1995. Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2479-2483.

- Frenkel, N., E. C. Schirmer, L. S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R. M. Danovich, and C. H. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:748-752.
- Frey, S. E., C. Harrison, R. F. Pass, E. Yang, D. Boken, R. E. Sekulovich, S. Percell, A. E. Izu, S. Hirabayashi, R. L. Burke, and A. M. Duliège.** 1999. Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* **180**:1700-1703.
- Früh K, and Y. Yang.** 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:76-81.
- Gallwitz, D., E. Bos, and H. Stahl.** 1978. Translation of HeLa cell histone messenger RNAs in cell-free protein synthesizing systems from rabbit reticulocytes, HeLa cells, and wheat germ. *Methods Cell. Biol.* **19**:197-213.
- Garstka, M., B. Borchert, M. Al-Balushi, P. V. Praveen, N. Kühl, I. Majoul, R. Duden, and S. Springer.** 2007. Peptide-receptive Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Cycle between Endoplasmic Reticulum and cis-Golgi in Wild-type Lymphocytes *J. Biol. Chem.* **282**:30680-30690.
- Gassen, H. G., and G. Schrimpf.** 2002. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5th ed., Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**:1424-1431.
- Geginat, G., T. Ruppert, H. Hengel, R. Holtappels, and U. H. Koszinowski.** 1997. IFN-gamma is a prerequisite for optimal antigen processing of viral peptides in vivo. *J. Immunol.* **158**:3303-3310.
- Germain, R. N..** 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**:287-299.
- Gibson, W..** 2006. Assembly and maturation of the capsid. p.231-244. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology.* Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Gil-Torregrosa, B. C., A. R. Castaño, D. López, and M. Del Val.** 2000. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* **1**:641-651.
- Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, C. W. McMahon, A. Kelly, D. G. Kavanagh, M. K. Slifka, U. H. Koszinowski, D. H. Raulet, and A. B. Hill.** 2004. Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation has little effect on the size or the effector memory phenotype of the CD8 T cell response. *J. Immunol.* **172**:6944-6953.

- Goldberg, A. L.**. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**:895-899.
- González, P. A., L. J. Carreño, D. Coombs, J. E. Mora, E. Palmieri, B. Goldstein, S. G. Nathenson, and A. M. Kalergis.** 2005. T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**:4824-4829.
- Gruter, W.**. 1924. Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Muench. Med. Wochenschr.* **71**:1058-1060.
- Grzimek, N. K., J. Podlech, H. P. Steffens, R. Holtappels, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 1999. In vivo replication of recombinant murine cytomegalovirus driven by the paralogous major immediate-early promoter-enhancer of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**:5043-5055.
- Hahn, Y. S., C. S. Hahn, and T. J. Braciale.** 1996. Endogenous presentation of a nascent antigenic epitope to CD8+ CTL is more efficient than exogenous presentation. *Immunol. Cell Biol.* **74**:394-400.
- Hammond, S. A., R. P. Johnson, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. Takiguchi, J. T. Safrit, R. A. Koup, and R. F. Siliciano.** 1995. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8+ CTL. *J. Immunol.* **154**:6140-6156.
- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon.** 1978. Congenital cytomegalovirus. *Major Probl. Clin. Pediatr.* **17**:97-152.
- Harty, J. T., A. R. Tinnereim, and D. W. White DW.** 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:275-308.
- Hashimoto-Gotoh, T., F. C. Franklin, A. Nordheim, and K. N. Timmis.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* **16**:227-235.
- Hengel, H., P. Lucin, S. Jonjić, T. Ruppert, and U. H. Koszinowski.** 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* **68**:289-297.
- Hengel, H., U. Reusch, A. Gutermann, H. Ziegler, S. Jonjic, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1999. Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol. Rev.* **168**:167-176.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.

- Hobom, U., W. Brune, M. Messerle, G. Hahn, and U. H. Koszinowski.** 2000. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* **74**:7720-7729.
- Hodgkin, P. D., A. A. Scalzo, N. Swaminathan, P. Price., and G. R. Shellam.** 1988. Murine cytomegalovirus binds reversibly to mouse embryo fibroblasts: implications for quantitation, and explanation of centrifugal enhancement. *J. Virol. Methods* **22**:215-230.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**:17-27.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'--3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7276-7280.
- Holtappels, R., D. Gillert-Marien, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2006a. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* **80**:7613-7624.
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 2002a. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORF m164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* **76**:6044-6053.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2006b. CD8 T cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient. p383-418. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**:11495-11503.
- Holtappels, R., J. Podlech, N. K. Grzimek, D. Thomas, M. F. Pahl-Seibert, and M. J. Reddehase.** 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* **75**: 6584-6600.
- Holtappels, R., J. Podlech, M.-F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* **199**:131-136.

- Holtappels, R., C. O. Simon, M. W. Munks, D. Thomas, P. Deegen, B. Kühnappel, T. Däubner, S. F. Emde, J. Podlech, N. K. Grzimek, S. A. Oehrlein-Karpi, A. B. Hill, and M. J. Reddehase.** 2008. Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J. Virol.* **82**:5781-5796.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002b. Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* **76**:151-164.
- Humphreys, I. R., C. de Trez, A. Kinkade, C. A. Benedict, M. Croft, and C. F. Ware.** 2007. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J. Exp. Med.* **204**:1217-1225.
- Honess, R. W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**:8-19.
- Horsburgh, B. C., M. M. Hubinette, D. Qiang, M. L. MacDonald, and F. Tufaro.** 1999. Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther.* **6**:922-930.
- Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**:118-133.
- Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* **81**:6241-6247.
- Jenkins, M. R., R. Webby, P. C. Doherty, and S. J. Turner.** 2006. Addition of a prominent epitope affects influenza A virus-specific CD8⁺ T cell immunodominance hierarchies when antigen is limiting. *J. Immunol.* **177**:2917-2925.
- Jensen, P. E., D. A. Weber, W. P. Thayer, L. E. Westerman, and C. T. Dao.** 1999. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol. Rev.* **172**:229-238.
- Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic.** 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses. p.285-320. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Jonjić, S., I. Pavić, B. Polić, I. Crnković, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1994. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* **179**:1713-1717.
- Kääriäinen, L., E. Klemola, and J. Paloheimo.** 1966. Rise of cytomegalovirus antibodies in an infectious-mononucleosis-like syndrome after transfusion. *Brit. Med. J.* **1**:1270-1272.
- Kavanagh, D. G., M. C. Gold, M. Wagner, U. H. Koszinowski, and A. B. Hill.** 2001a. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J. Exp. Med.* **194**:967-978.

- Kavanagh, D. G., U. H. Koszinowski, and A. B. Hill.** 2001b. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J. Immunol.* **167**:3894-3902.
- Keçsmir, C., A. K. Nussbaum, H. Schild, V. Detours, and S. Brunak.** 2002. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng.* **15**:287-296.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**:784-795.
- Kelly, J. M., S. J. Sterry, S. Cose, S. J. Turner, J. Fecondo, S. Rodda, P. J. Fink, and F. R. Carbone.** 1993. Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class I-bound determinant. *Eur. J. Immunol.* **23**:3318-3326.
- Khan, S., A. Zimmermann, M. Basler, M. Groettrup, and H. Hengel.** 2004. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J. Virol.* **78**:1831-1842.
- Kleijnen, M. F., J. B. Huppa, P. Lucin, S. Mukherjee, H. Farrell, A. E. Campbell, U. H. Koszinowski, A. B. Hill, and H. L. Ploegh.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**:685-694.
- Klenovsek, K., F. Weisel, A. Schneider, U. Appelt, S. Jonjic, M. Messerle, B. Bradel-Tretheway, T. H. Winkler, and M. Mach.** 2007. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood.* **110**:3472-3479.
- Kloetzel, P. M.** 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* **5**:661-669.
- Kloetzel, P. M., and F. Ossendorp.** 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:76-81.
- Klonis, N., M. Rug, I. Harper, M. Wickham, A. Cowman, and L. Tilley.** 2002. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur. Biophys. J.* **31**:36-51.
- Koch, J., and R. Tampé.** 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:653-662.
- Korber, B., L. Hood, and I. Stroynowski.** 1987. Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to the transcription initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:3380-3384.
- Krmpotić, A., I. Bubić, B. Polić, P. Lućin, and S. Jonjić.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* **5**:1263-1277.

- Krmpotić, A., D. H. Busch, I. Bubić, F. Gebhardt, H. Hengel, M. Hasan, A. A. Scalzo, U. H. Koszinowski, and S. Jonjić. 2002. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:529-535.
- Krmpotic, A., M. Messerle, I. Crnkovic-Mertens, B. Polic, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski. 1999. The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo. *J. Exp. Med.* **190**:1285-96.
- Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris, and M. J. Reddehase. 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**:2980-2987.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**:269-297.
- Lautscham, G., A. Rickinson, and N. Blake. 2003. TAP-independent antigen presentation on MHC class I molecules: lessons from Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* **5**:291-299.
- Lee, S. H., S. Girard, D. Macina, M. Busà, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, and S. M. Vidal. 2001. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* **28**:42-45.
- Lehner, P. J.. 2003. The calculus of immunity: quantitating antigen processing. *Immunity* **18**:315-317.
- Lenkei, R., J. W. Gratama, G. Rothe, G. Schmitz, J. L. D'hautcourt, A. Arekrans, F. Mandy, and G. Marti. 1998. Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* **33**:188-196.
- Lilley B., and H. Ploegh. 2005. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol. Rev.* **207**:126-144.
- Lin, A., H. Xu, and W. Yan. 2007. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell. Mol. Immunol.* **4**:91-98
- Lindquister, G. J., and P. E. Pellett. 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**:102-110.
- Loh, J., D. T. Chu, A. K. O'Guin, W. M. Yokoyama, and H. W. Virgin 4th. 2005. Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J. Virol.* **79**:661-667.
- LoPiccolo, D. M., M. C. Gold, D. G. Kavanagh, M. Wagner, U. H. Koszinowski, and A. B. Hill. 2003. Effective inhibition of K(b)- and D(b)-restricted antigen presentation in primary macrophages by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **77**:301-308.

- Mathys, S., T. Schroeder, J. Ellwart, U. H. Koszinowski, M. Messerle, and U. Just.** 2003. Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* **187**:988-999.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatenes. *Virology* **162**:98-107.
- Marrack, P., and J. Kappler.** 1987. The T cell receptor. *Science* **238**:1073-1079.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J. Virol.* **66**:27-36.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning, and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:14759-14763.
- Michel, D., and T. Mertens.** 2006. Antiviral intervention, resistance, and perspectives. p.573-590. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Miller, R. G., and M. Dunkley.** 1974. Quantitative analysis of the ⁵¹Cr release cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes. *Cell. Immunol.* **14**:284-302.
- Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**:231-238.
- Miyahira, Y., K. Murata, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban, M. M. Rodrigues, and F. Zavala.** 1995. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT Assay. *J. Immunol. Methods* **181**:45-54.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2007. Cytomegaloviruses. p.2701-2772. In D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), *Fields Virology 5th Edition*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Moore M. W., F. R. Carbone, and M. J. Bevan.** 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* **54**:777-785.
- Moskowitz, L., G. T. Hensley, J. C. Chan, and K. Adams.** 1985. Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**:735-738.
- Mothe, B. R., H. Horton, D. K. Carter, T. M. Allen, M. E. Liebl, P. Skinner, T. U. Vogel, S. Fuenger, K. Vielhuber, W. Rehrauer, N. Wilson, G. Franchini, J. D. Altman, A. Haase, L. J. Picker, D. B. Allison, and D. I. Watkins.** 2002. Dominance of CD8 responses specific for epitopes bound by a single major histocompatibility complex class I molecule during the acute phase of viral infection. *J. Virol.* **76**:875-884.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**:335-350.

- Munks, M. W., K. S. Cho, A. K. Pinto, S. Sierro, P. Klenerman, and A. B. Hill.** 2006a. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **177**:450-458.
- Munks, M. W., M. C. Gold, A. L. Zajac, C. M. Doom, C. S. Morello, D. H. Spector, and A. B. Hill.** 2006b. Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* **176**:3760-3766.
- Munks, M. W., A. K. Pinto, C. M. Doom, and A. B. Hill.** 2007. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **178**:7235-7241.
- Murphy, E., I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. E. Shenk.** 2003. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:13585-13590.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645-1658.
- Nakatsu, F., and H. Ohno.** 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell. Struct. Funct.* **28**:419-429.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson.** 2003. Convergence of non-clathrin and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol. Biol. Cell.* **14**:417-431.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson.** 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol. Biol. Cell.* **15**:3542-3552.
- Neiman, P. E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. G. Lerner, G. E. Sale, and E. D. Thomas.** 1977. A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* **136**:754-767.
- Nielsen, M, C. Lundegaard, P. Worning, C. S. Hvid, K. Lamberth, S. Buus, S. Brunak, and O. Lund.** 2004. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics* **20**:1388-97.
- Nikolić-Zugčić J., and M. J. Bevan.** 1990. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature.* **344**:65-67.
- Nisbet, A. D., R. H. Saundry, A. J. Moir, L. A. Fothergill, and J. E. Fothergill.** 1981. The complete amino acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* **115**: 335-345.
- O'Connor, M., M. Peifer, and W. Bender.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**:1307-1312.

- O'Herrin, S. M., M. S. Lebowitz, J. G. Bieler, B. K. al-Ramadi, U. Utz, A. L. Bothwell, and J. P. Schneck.** 1997. Analysis of the expression of peptide-major histocompatibility complexes using high affinity soluble divalent T cell receptors. *J. Exp. Med.* **186**:1333-1345.
- Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 4922-4931.
- Ojcius, D. M, J. P. Abastado, A. Casrouge, E. Mottez, L. Cabanie, and P. Kourilsky.** 1993. Dissociation of the peptide-MHC class I complex limits the binding rate of exogenous peptide. *J. Immunol.* **151**:6020-6026.
- Oram, J. D., R. G. Downing, A. Akrigg, A. A. Dollery, C. J. Duggleby, G. W. Wilkinson, and P. J. Greenaway.** 1982. Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **59**:111-129.
- Osborn, J. E., and Walker, D. L.** 1968. Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J. Virol.* **2**:853-858.
- Pass, R. F., A. M. Duliege, S. Boppana, R. Sekulovich, S. Percell, W. Britt, and R. L. Burke.** 1999. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J. Infect. Dis.* **180**:970-975.
- Pellett, P. E., and B. Roizman.** 2007. The family: Herpesviridae a brief introduction. p.2479-2500. In D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), *Fields Virology* 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Pepperl, S., J. Münster, M. Mach, J. R. Harris, and B. Plachter.** 2000. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J. Virol.* **74**:6132-6146.
- Pepperl-Klindworth, S., N. Frankenberg, and B. Plachter.** 2002. Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *J. Clin. Virol.* **25**:Suppl. 2 75-85.
- Pepperl-Klindworth, S., and B. Plachter.** 2006. Current perspectives in vaccine development. p.551-572. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Pinto, A. K., and A. B. Hill.** 2005. Viral interference with antigen presentation to CD8+ T cells: lessons from cytomegalovirus. *Viral. Immunol.* **18**:434-444.
- Plotkin, S. A., S. E. Starr, H. M. Friedman, E. Gönczöl, and R. E. Weibel.** 1989. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J. Infect. Dis.* **159**:860-865.
- Plummer, G..** 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog. Med. Virol.* **9**:302-340.

- Pluskal, M. G.** 1986. Immobilon PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for blotting of proteins. *BioTechniques* **4**:272-283.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus, p.493-525. *In* S. H. E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 2nd ed., vol. 32. Academic Press, London and San Diego, Cal.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**:2099-2104.
- Poncellet, P., and P. Carayon.** 1985. Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **85**:65-74.
- Porgador, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain.** 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**:715-726.
- Pósfai, G., M. D. Koob, H. A. Kirkpatrick, and F. R. Blattner.** 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* **179**:4426-4428.
- Princiotta, M. F., D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgerit, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**:343-354.
- Puius, Y., and D. Snyderman.** 2007. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**:419-424.
- Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz, and F. A. Ennis.** 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* **273**:541-543.
- Radsak, K., K. H. Brücher, W. Britt, H. Shiou, D. Schneider, and A. Kollert.** 1990. Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **177**:515-522.
- Raghavan, M., N. Del Cid, S. M. Rizvi, and L. R. Peters.** 2008. MHC class I assembly: out and about. *Trends Immunol.* **29**:436-443.
- Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rötzschke.** 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:213-244.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833-8849.
- Reche, P. A., J.-P. Glutting, and E. L. Reinherz.** 2002. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum. Immunol.* **63**:701-709.

- Reche, P. A., J.-P. Glutting, H. Zhang, and E. L. Reinherz.** 2004. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* **56**:405-419.
- Reddehase, M. J..** 2002. Antigens and immuno-evasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:831-844.
- Reddehase, M. J., M. Baltesen, M. Rapp, S. Jonjić, I. Pavić, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* **179**:185-193.
- Reddehase, M. J., M. R. Fibi G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1986. Late-phase expression of a murine cytomegalovirus immediate-early antigen recognized by cytolytic T lymphocytes. *J. Virol.* **60**:1125-1129.
- Reddehase, M. J., and U. H. Koszinowski.** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **312**:369-371.
- Reddehase, M. J., and U. H. Koszinowski.** 1991. Redistribution of critical major histocompatibility complex and T cell receptor-binding functions of residues in an antigenic sequence after biterminal substitution. *Eur. J. Immunol.* **21**:1697-1701.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**:3102-3108.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* **25**:Suppl 2 23-36.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, J. Podlech, and R. Holtappels.** 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum Immunol.* **65**:446-455.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. Grzimek.** 2008. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:315-331.
- Reddehase, M. J., J. B. Rothbard, and U. H. Koszinowski.** 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* **337**:651-653.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Münch, S. Jonjic, A. Lüske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**:264-273.
- Reinke P., S. Prösch, F. Kern, and H. D. Volk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* **1**:157-164.

- Reusch, U., O. Bernhard, U. Koszinowski, and P. Schu.** 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic* **3**:752-761.
- Reusch, U., W. Muranyi, P. Lucin, H. G. Burgert, H. Hengel, and U. H. Koszinowski.** 1999. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* **18**:1081-1091.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**:1373-1380.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**:238-241.
- Rock, K. L., I. A. York, and A. L. Goldberg.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**:670-677.
- Rock, K., I. York, T. Saric, and A. Goldberg.** 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* **80**:1-70.
- Rötzschke, O., K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, and H. G. Rammensee.** 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**:252-254.
- Rötzschke, O., K. Falk, S. Stevanović, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee.** 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.*, **21**:2891-2894.
- Rognan, D., M. J. Reddehase, U. H. Koszinowski, and G. Folkers.** 1992. Molecular modeling of an antigenic complex between a viral peptide and a class I major histocompatibility glycoprotein. *Proteins* **13**:70-85.
- Roizman B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.
- Roizman B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, K. Wolf, et al..** 1981 Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201-217.
- Roizmann, B., R. Desrosiers, B. Fleckenstein, and C. Lopez.** 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **123**:425-449.
- Ross, S., K. Fowler, G. Ashrith, S. Stagno, W. Britt, R. Pass, and S. Boppana.** 2006. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J. Pediatr.* **148**:332-336.

- Rouse, B. T., P. P. Sarangi, and S. Suvas.** 2006. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol. Rev.* **212**:272-286.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson.** 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:419-466.
- Saiki, R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, and H. A. Erlich.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:6230-6234.
- Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd ed.. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono M.** 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. **133**:775-787.
- Saric, T., S.-C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, and A. L. Goldberg.** 2002. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**:1169-1176.
- Sarov, I., and I. Abady.** 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**:464-473.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, A. Simmons, A. B. La Vista, and G. R. Shellam.** 1990. *Cmv1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* **171**:1469-1483.
- Schnorrer, P., G. M. Behrens, N. S. Wilson, J. L. Pooley, C. M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G. T. Belz, F. R. Carbone, K. Shortman, W. R. Heath, and J. A. Villadangos.** 2006. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**:10729-10734.
- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri.** 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**:480-483.
- Shen L., and K. L. Rock.** 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:85-91.
- Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino, and K. L. Rock.** 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**:77-80.
- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. Reddehase, and N. K. Grzimek.** 2006. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436-10456.

- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**:326-40.
- Sinzger, C..** 2008. Entry route of HCMV into endothelial cells. *J. Clin. Virol.* **41**:174-179.
- Smith, G. A., and L. W. Enquist.** 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome, and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4873-4878.
- Smith, G. R..** 1988a. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **52**:1-28.
- Smith, H. R. C., J. W. Heusel, I. K. Mehta, S. Kim, B. G. Dorner, O. V. Naidenko, K. Iizuka, H. Furukawa, D. L. Beckman, J. T. Pingel, A. A. Scalzo, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama.** 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:8826-8831.
- Smith, K. A..** 1984. Interleukin 2. *Annu. Rev. Immunol.* **2**:319-333
- Smith, K. A..** 1988b. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**:1169-1176.
- Smith, M. G..** 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**:435-440.
- Smith, M. G..** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**:424-430.
- Smith P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, and M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* **136**:1007-1021.
- Stagno, S., and R. J. Whitley.** Herpesvirus infections of pregnancy. 1985. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* **313**:1270-1274.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton, and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**:945-949.
- Starr, S. E., J. P. Glazer, H. M. Friedman, J. D. Farquhar, and S. A. Plotkin.** 1981. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J. Infect. Dis.* **143**:585-589.
- Steffens, H. P., S. Kurz, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 1998. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J. Virol.* **72**:1797-1804.

- Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tréboul, and P. Gay.** 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase, and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* **200**:220-228.
- Stemberger, C., M. Neuenhahn, V. R. Buchholz, and D. H. Busch.** 2007a. Origin of CD8⁺ effector and memory T cell subsets. *Cell. Mol. Immunol.* **4**:399-405.
- Stemberger, C., and A. Single.** 2007b. Naive CD8⁺ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets. *Immunity* **27**:985-997.
- Stevanović, S., and H. Schild.** 1999. Quantitative aspects of T cell activation - peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol.* **11**:375-384.
- Streblow, D, S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Strehl, B., U. Seifert, E. Krüger, S. Heink, U. Kuckelkorn, and P. M. Kloetzel.** 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* **207**:19-30.
- Sugawara, N., G. Ira, and J. E. Haber.** 2000. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* **20**:5300-5309.
- Swaminathan, S., and S. K. Sharan.** 2004. Bacterial Artificial Chromosome Engineering, p.89-106. In S. Zhao, and M. Stodolsky (ed.), *Bacterial Artificial Chromosomes, Methods Mol. Biol.*, vol. 256. Totowa, Humana Press NJ, USA.
- Sykulev, Y., A. Brunmark, T. J. Tsomides, S. Kageyama, M. Jackson, P. A. Peterson, and H. N. Eisen.** 1994. High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11487-11491.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T. J. Tsomides, and H. N. Eisen.** 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* **4**:565-571.
- Tang, Q., E. A. Murphy, and G. G. Maul.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection, and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* **80**:6873-6882.
- Tarkowski, A., C. Czerkinsky, L. A. Nilsson, H. Nygren, and O. Uchterslony.** 1984. Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of IgG rheumatoid factor-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **72**:451-459.
- Tay, C. H., and R. M. Welsh.** 1997. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J. Virol.* **71**:267-275.

- Thäle, R., U. Szepan, H. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1995. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* **69**:6098-6105.
- Tenzer, S., B. Peters, S. Bulik, O. Schoor, C. Lemmel, M. M. Schatz, P. M. Kloetzel, H. G. Rammensee, H. Schild, and H. G. Holzhütter.** 2005. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**:1025-1037.
- Toes, R. E., A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T. P. Dick, J. Müller, B. Schönfish, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild.** 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**:1-12.
- Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* **60**:163-178.
- Towne, C. F., I. A. York, L. B. Watkin, J. S. Lazo, and K. L. Rock.** 2007. Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J. Immunol.* **178**:6923-6930.
- Townsend, A. R., J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith, and A. J. McMichael.** 1986. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**:959-968.
- Valitutti, S., S. Müller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia.** 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature.* **375**:148-151.
- van Bleek, G. M., and S. G. Nathenson.** 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. **348**:213-216.
- van der Most, R. G., K. Murali-Krishna, J. G. Lanier, E. J. Wherry, M. T. Puglielli, J. N. Blattman, A. Sette, and R. Ahmed.** 2003. Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. *Virology* **315**: 93-102.
- van der Most, R. G., A. Sette, C. Oseroff, J. Alexander, K. Murali-Krishna, L. L. Lau, S. Southwood, J. Sidney, R. W. Chesnut, M. Matioubian, and R. Ahmed.** 1996. Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* **157**:5543-5554.
- van Dommelen, S. L., H. A. Tabarias, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti.** 2003. Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* **77**:1877-1884.

- van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. Wickner (ed.).** 2000. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, Inc., San Diego, CA USA.
- Venema, H., A. P. van den Berg, C. van Zanten, W. J. van Son, M. van der Giessen, and T. H. The.** 1994. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* **42**:188-192.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini.** 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**:503-510.
- Vidal, S. M., and L. L. Lanier.** 2006. NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **298**:183-206.
- Wagner, M., A. Gutermann, J. Podlech, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2002. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative, and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**:805-816.
- Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**:7056-7060.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell.** 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**:1038-1044.
- Wang, X., S.-M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E.-S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456-461.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *InterVirology* **26**:192-201.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. Scott.** 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**:130-132.
- Welsh, R. M., J. O. Brubaker, M. Vargas-Cortes, and C. L. O'Donnell.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* **173**:1053-63.
- Whitley, R. J..** 2004. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **549**:155-160.

- Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH , and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, **22**:474-476, 478-481.
- Wirtz, N., S. I. Schader, R. Holtappels, C. O. Simon, N. A. Lemmermann, M. J. Reddehase, and J. Podlech.** 2008. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:151-158.
- Ye, M., C. S. Morello, and D. H. Spector.** 2002. Strong CD8 T-cell responses following coimmunization with plasmids expressing the dominant pp89 and subdominant M84 antigens of murine cytomegalovirus correlate with long-term protection against subsequent viral challenge. *J. Virol.* **76**:2100-2112.
- Yewdell, J. W..** 2001. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* **11**:294-297.
- Yewdell, J. W..** 2006. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:79-86.
- Yewdell, J. W., and J. R. Bennink.** 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:51-88.
- York, I. A., S.-C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg, and K. L. Rock.** 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**:1177-1184.
- Young, A. C., W. Zhang, J. C. Sacchettini, and S. G. Nathenson.** 1995. MHC class I peptide interactions and TCR recognition. *Cancer Surv.* **22**:17-36.
- Ziegler, H., W. Muranyi, H. G. Burgert, E. Kremmer, and U. H. Koszinowski.** 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**:870-881.
- Ziegler, H., R. Thale, P. Lucin, W. Muranyi, T. Flohr, H. Hengel, H. Farrell, W. Rawlinson, and U. H. Koszinowski.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* **6**:57-66.
- Zimmermann, K., D. Schögl, and J. W. Mannhalter.** 1998. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *BioTechniques* **24**:582-584.

7 Anhang

Tab. 15: Absolute Quantifizierung der K^b-Moleküle an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit mCMV-Rekombinanten

Gruppe	Absolut	Mittelwert	Min.Wert	unteres Quartil (25%-Quantil)	Median	obere Quartil (75%-Quantil)	Max.Wert
n.i.	2,50×10 ⁵	2,64×10 ⁵	2,45×10 ⁵	2,50×10 ⁵	2,53×10 ⁵	2,57×10 ⁵	3,17×10 ⁵
	2,45×10 ⁵						
	3,17×10 ⁵						
	2,53×10 ⁵						
	2,57×10 ⁵						
m164 negative Zellen in infizierter Kultur	2,47×10 ⁵	3,22×10 ⁵	2,25×10 ⁵	3,06×10 ⁵	3,27×10 ⁵	3,52×10 ⁵	4,17×10 ⁵
	2,47×10 ⁵						
	4,17×10 ⁵						
	3,32×10 ⁵						
	3,36×10 ⁵						
	3,27×10 ⁵						
	3,15×10 ⁵						
	3,28×10 ⁵						
	3,54×10 ⁵						
	3,86×10 ⁵						
	3,52×10 ⁵						
	3,08×10 ⁵						
	3,65×10 ⁵						
	3,17×10 ⁵						
	2,25×10 ⁵						
	3,00×10 ⁵						
m164 positive Zellen mCMV-vRAP Infektion	5,68×10 ⁴	3,32×10 ⁴	2,35×10 ⁴	2,43×10 ⁴	2,46×10 ⁴	3,82×10 ⁴	5,68×10 ⁴
	2,39×10 ⁴						
	2,44×10 ⁴						
	2,46×10 ⁴						
	2,43×10 ⁴						
	2,35×10 ⁴						
	3,64×10 ⁴						
	3,82×10 ⁴						
	4,64×10 ⁴						
m164 positive Zellen nach mCMV-vRAP- SIINFEKL Infektion	5,64×10 ⁴	4,37×10 ⁴	3,38×10 ⁴	3,47×10 ⁴	4,24×10 ⁴	5,14×10 ⁴	5,64×10 ⁴
	3,38×10 ⁴						
	3,50×10 ⁴						
	4,97×10 ⁴						
m164 positive Zellen nach mCMV-ΔvRAP Infektion	1,08×10 ⁵	1,39×10 ⁵	1,08×10 ⁵	1,16×10 ⁵	1,26×10 ⁵	1,38×10 ⁵	2,13×10 ⁵
	1,34×10 ⁵						
	1,24×10 ⁵						
	1,13×10 ⁵						
	1,26×10 ⁵						
	1,38×10 ⁵						
	1,16×10 ⁵						
	2,13×10 ⁵						
	1,82×10 ⁵						
m164 positive Zellen nach mCMV- ΔvRAP-SIINFEKL Infektion	1,26×10 ⁵	1,64×10 ⁵	1,25×10 ⁵	1,26×10 ⁵	1,41×10 ⁵	2,02×10 ⁵	2,29×10 ⁵
	2,02×10 ⁵						
	1,25×10 ⁵						
	1,41×10 ⁵						
	2,29×10 ⁵						

Tab. 16: Absolute Quantifizierung der mit SIINFEKL beladenen K^b-Molekülen an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit mCMV-Rekombinanten

Gruppe	Absolut	Mittelwert	Min.-Wert	unteres Quartil (25%-Quantil)	Median	obere Quartil (75%-Quantil)	Max.-Wert
m164 negative Zellen in infizierter Kultur	$2,95 \times 10^1$	$1,05 \times 10^2$	$1,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-1}$	$2,95 \times 10^1$	$5,16 \times 10^1$	$4,45 \times 10^2$
	$1,00 \times 10^{-1}$						
	$4,45 \times 10^2$						
	$5,16 \times 10^1$						
	$1,00 \times 10^{-1}$						
m164 positive Zellen nach mCMV-vRAP Infektion	$1,00 \times 10^{-1}$	$8,18 \times 10^1$	$1,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^1$	$3,87 \times 10^2$
	$1,00 \times 10^{-1}$						
	$1,00 \times 10^{-1}$						
	$3,87 \times 10^2$						
	$2,17 \times 10^1$						
m164 positive Zellen nach mCMV-vRAP-SIINFEKL Infektion	$1,00 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^2$	$1,00 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-1}$	$1,99 \times 10^2$	$3,28 \times 10^2$	$4,87 \times 10^2$
	$3,28 \times 10^2$						
	$1,00 \times 10^{-1}$						
	$4,87 \times 10^2$						
	$1,99 \times 10^2$						
m164 positive Zellen nach mCMV-ΔvRAP Infektion	$1,78 \times 10^2$	$1,06 \times 10^2$	$1,00 \times 10^{-1}$	$4,89 \times 10^1$	$1,22 \times 10^2$	$1,79 \times 10^2$	$1,81 \times 10^2$
	$1,81 \times 10^2$						
	$1,00 \times 10^{-1}$						
	$6,51 \times 10^1$						
m164 positive Zellen nach mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL Infektion	$8,96 \times 10^3$	$1,04 \times 10^4$	$2,71 \times 10^3$	$6,60 \times 10^3$	$1,10 \times 10^4$	$1,41 \times 10^4$	$1,71 \times 10^4$
	$1,71 \times 10^4$						
	$1,45 \times 10^4$						
	$2,71 \times 10^3$						
	$5,82 \times 10^3$						
	$1,30 \times 10^4$						

Tab. 17: Absolute Quantifizierung von SIINFEKL beladenen K^b-Molekülen an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach exogener Beladung mit synthetischem Peptid

Exogen beladene MEF	SIINFEKL [M]	Absolut	H2-K ^b	SIINFEKL-K ^b /1×10 ⁵	Beladung in %
m164 negative Zellen in infizierter Kultur	1×10 ⁻⁴	1,51×10 ⁴	2,50×10 ⁵	6,04×10 ³	6,04
	1×10 ⁻⁵	2,56×10 ³	2,45×10 ⁵	1,04×10 ³	1,04
	1×10 ⁻⁶	2,44×10 ³	3,17×10 ⁵	7,71×10 ²	0,77
	1×10 ⁻⁷	1,58×10 ³	2,53×10 ⁵	6,26×10 ²	0,63
	1×10 ⁻⁸	3,25×10 ²	2,57×10 ⁵	1,27×10 ²	0,13
m164 positive Zellen nach mCMV-vRAP Infektion	1×10 ⁻⁴	1,00×10 ⁻¹	2,39×10 ⁴	1,00×10 ⁻¹	0,00
	1×10 ⁻⁵	1,00×10 ⁻¹	2,44×10 ⁴	1,00×10 ⁻¹	0,00
	1×10 ⁻⁶	1,47×10 ²	2,46×10 ⁴	5,96×10 ¹	0,60
	1×10 ⁻⁷	1,00×10 ⁻¹	2,43×10 ⁴	1,00×10 ⁻¹	0,00
	1×10 ⁻⁸	1,00×10 ⁻¹	2,35×10 ⁴	1,00×10 ⁻¹	0,00
m164 positive Zellen nach mCMV-ΔvRAP Infektion	1×10 ⁻⁴	1,09×10 ³	1,08×10 ⁵	1,01×10 ³	1,01
	1×10 ⁻⁵	1,28×10 ²	1,34×10 ⁵	9,56×10 ¹	0,10
	1×10 ⁻⁶	1,58×10 ²	1,24×10 ⁵	1,27×10 ²	0,13
	1×10 ⁻⁷	1,00×10 ⁻¹	1,13×10 ⁵	1,00×10 ⁻¹	0,00
	1×10 ⁻⁸	1,00×10 ⁻¹	1,26×10 ⁵	1,00×10 ⁻¹	0,00
m164 negative Zellen nach mCMV-vRAP Infektion	1×10 ⁻⁴	2,16×10 ⁴	3,32×10 ⁵	6,49×10 ³	6,49
	1×10 ⁻⁵	8,28×10 ³	3,35×10 ⁵	2,46×10 ³	2,47
	1×10 ⁻⁶	5,57×10 ³	3,27×10 ⁵	1,70×10 ³	1,70
	1×10 ⁻⁷	4,26×10 ³	3,15×10 ⁵	1,35×10 ³	1,35
	1×10 ⁻⁸	1,84×10 ³	3,28×10 ⁵	5,60×10 ²	0,56
m164 negative Zellen nach mCMV-ΔvRAP	1×10 ⁻⁴	2,23×10 ⁴	3,54×10 ⁵	2,36×10 ³	6,29
	1×10 ⁻⁵	8,34×10 ³	3,86×10 ⁵	1,70×10 ³	2,16
	1×10 ⁻⁶	6,57×10 ³	3,52×10 ⁵	1,44×10 ³	1,87
	1×10 ⁻⁷	5,08×10 ³	3,08×10 ⁵	1,68×10 ³	1,65
	1×10 ⁻⁸	5,16×10 ³	3,65×10 ⁵	1,41×10 ³	1,41

Tab. 18: Berechnung des Prozentsatzes endogen mit SIINFEKL beladener K^b-Moleküle an der Oberfläche von C57BL/6 MEF nach Infektion mit rekombinantem mCMV

Endogen beladene MEF	Absolut	H2-K ^b	SIINFEKL-K ^b /1×10 ⁵	Beladung in %
m164 positive Zellen nach mCMV-ΔvRAP-SIINFEKL Infektion	8,96×10 ³	1,26×10 ⁵	7,11×10 ³	7,11
	1,71×10 ⁴	2,02×10 ⁴	8,47×10 ³	8,47
	1,45×10 ⁴	1,25×10 ⁴	1,16×10 ⁴	11,64
	2,71×10 ³	7,86×10 ⁴	3,45×10 ³	3,45
	5,82×10 ³	1,41×10 ⁴	4,12×10 ³	4,12
	1,30×10 ⁴	2,29×10 ⁴	5,67×10 ³	5,67
m164 positive Zellen nach mCMV-vRAP-SIINFEKL Infektion	1,00×10 ⁻¹	5,64×10 ⁴	1,00×10 ⁻¹	0,00
	3,28×10 ²	3,38×10 ⁴	9,69×10 ²	0,97
	4,87×10 ²	3,50×10 ⁴	1,39×10 ³	1,39
	1,99×10 ²	4,97×10 ⁴	4,00×10 ²	0,40

Lebenslauf

Name: Niels Lemmermann

Geburtsdatum: 12.11.1977

Geburtsort: Berlin-Wilmersdorf

Schulbildung:

1990-1997 Wilhelm-Gymnasium Braunschweig

1989-1990 Orientierungsstufe Leonhardstr. Braunschweig

1988-1989 Orientierungsstufe Georg-Eckert-Str. Braunschweig

1984-1988 Grundschule Friesenstr. Braunschweig

Studium:

1998-2003 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg

Diplomarbeit:

2002-2003 Diplomarbeit am Institut für Virologie Philipps-Universität Marburg zum Thema: „HCMV-pUL50, ein Protein der inneren Kernmembran, Untersuchungen zu Struktur und Interaktion mit anderen Proteinen“ unter Leitung von Prof. Dr. K. Radsak

Abschlüsse:

2003 Diplom mit dem Titel Diplom Humanbiologe

1997 Allgemeine Hochschulreife

Promotion:

2003-2008 Promotionsarbeit am Institut für Virologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz unter Leitung von Prof. Dr. M. J. Reddehase

berufliche Tätigkeit:

seit 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

1997-1998 Zivildienst beim Studentenwerk Braunschweig

Publikationen:

Papers:

- Böhm, V., C. O. Simon, J. Podlech, C. K. Seckert, D. Gendig, P. Deegen, D. Gillert-Marien, N. A. W. Lemmermann, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2008 The immune evasion paradox: Immuno-evasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T Cells by preventing negative feed-back regulation. *J. Virol.* **82**:11637-11650.
- Böhm, V., J. Podlech, D. Thomas, P. Deegen, M. F. Pahl-Seibert, N. A. Lemmermann, N. K. Grzimek, S. A. Oehrlein-Karpi, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2008. Epitope-specific in vivo protection against cytomegalovirus disease by CD8 T cells in the murine model of preemptive immunotherapy. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:135-144.
- Lemmermann, N. A. W., V. Böhm, K. Gergely, P. Deegen, C. O. Simon, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2009. Molecular quantitation of murine cytomegalovirus immune-evasion. In preparation.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. A. Grzimek.** 2008. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**:315-332.
- Wilhelmi, V., C. O. Simon, J. Podlech, V. Böhm, T. Däubner, S. Emde, D. Strand, A. Renzaho, N. A. Lemmermann, C. K. Seckert, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek.** Transactivation of cellular genes involved in nucleotide metabolism by the regulatory IE1 protein of murine cytomegalovirus is not critical for viral replicative fitness in quiescent cells and host Tissues. *J. Virol.* **82**:9900-9916.
- Wirtz, N., S. I. Schader, R. Holtappels, C. O. Simon, N. A. Lemmermann, M. J. Reddehase, and J. Podlech.** 2008. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**:151-158.

Books:

- Reddehase, M. J. (ed.), N. Lemmermann (ass. ed.).** 2006. Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Abstracts:

- Lemmermann, N. A. W., V. Böhm, P. Deegen, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase .**
2009. Molecular Quantitation of Cytomegalovirus Immune Evasion. 12th Int. Cytomegalovirus and Beta-herpesvirus Workshop, Boston, MA, USA (oral presentation).
- Marquardt, A., A. Busche, S. Halle, N. Lemmermann, M. J. Reddehase, R. Förster, and M. Messerle.** 2009. Monitoring of mouse cytomegalovirus infection in vivo using a novel multiple-reporter mutant. 19. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Leipzig, Germany (poster presentation).
- Gergely, K. M., S. I. Schader, M. Messerle M. J. Reddehase, and N. A. W. Lemmermann.**
2009. Establishment of a murine challenge model for the optimization of immunotherapy and prophylaxis of cytomegalovirus disease. 19. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Leipzig, Germany (poster presentation).
- Lemmermann, N., K. Gergely, V. Böhm, P. Deegen, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek.**
2008. Quantitation and imaging of cytomegalovirus immune evasion. 18. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, Germany. (oral presentation).
- Lemmermann N., V. Böhm, P. Deegen, R. Holtappels, C. Simon, T. Däubner, J. Podlech, S. Oehrlein-Karpi, N. Grzimek-Koschewa, and M. J. Reddehase.** 2007. Molecular quantitation of mCMV Immune evasion. Waldhausen Castle Symposium, Mainz, Germany. (oral presentation).
- Lemmermann, N., V. Böhm, P. Deegen, R. Holtappels, C. Simon, T. Däubner, J. Podlech, S. Oehrlein-Karpi, N. Grzimek-Koschewa, and M. J. Reddehase.** 2007. Molecular quantitation of cytomegalovirus immune evasion. Abstr. 8.01, 32nd Int. Herpesvirus Workshop, Asheville, NC, USA. (oral presentation).
- Lemmermann, N., T. Däubner, D. Thomas, A. Renzaho, N. Grzimek, R. Holtappels, M. J. Reddehase, and S. A. Oehrlein-Karpi.** 2006. Construction of an orthotopic CD8 T cell epitope swap mutant of murine cytomegalovirus. Abstr. AIR 04, 16. Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, München, Germany. (poster presentation).

Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Drs. Aumüller, Becker, Berndt, Daut, Elsässer, Engelhardt, Frenking, Garten, Grzeschik, Gudermann, Heeg, Herz, Jungclas, Kaiser, Kirchner, Klenk, Knöller, Koch, Kuhn, Lenz, Lill, Müller, Radsak, Rogausch, Schäfer, Seitz, Suske, Tampé, Teusch, Voigt, von Löw, Weihe und Westermann

in Mainz: Drs. Grzimek, Holtappels, Plachter und Reddehase.

Danksagung

Auch diese Arbeit konnte nur durch die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen entstehen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Ein herzlicher Dank an Prof. Dr. Matthias J. Reddehase für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie aller mit ihr verbundenen Diskussionen.

Prof. Dr. Klaus Heeg möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Dissertation gegenüber dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zu vertreten.

Dr. Natascha Grzimek-Koschewa danke ich für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Betreuung meiner molekularbiologischen Arbeiten und die ausdauernden Korrekturen meiner Arbeit.

Die immunologischen Arbeiten konnten nur durch die außergewöhnliche Hilfe von Verena Böhm erstellt werden – nur so war diese Arbeit zu vollenden. Gleiches gilt für Petra Deegen die tatkräftig die FACS-Analysen gemessen und ausgewertet hat.

Bei Dr. Christian Simon bedanke ich mich für die Einführung in die Mutagenese von mCMV-Genomen und die hilfreichen und aufmunternden Gespräche.

PD Dr. Rafaela Holtappels-Geginat danke ich für immunologische Hilfestellungen, interessante Gespräche und Korrekturen.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts, die jeder für sich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. So war die Atmosphäre und stete Hilfsbereitschaft eine nicht zu unterschätzende Motivation, auch schlechte Tage durchzustehen. Namentlich seien dabei insbesondere Dr. Katja Erlach, Dr. Christof Seckert, Dr. Torsten Däubner, Annette Fink und Stefan Ebert zu erwähnen. Auch die Bewohner des weiteren Doktorandenzimmers sollen nicht unerwähnt bleiben: Kerstin Gergely, Dr. Kai Kropp, Sina Schader, Sabine Scheller und Vanessa Wilhelmi.

Vielen Dank an Dr. Jürgen Podlech und Martin Knabe für ihre hervorragenden histologischen Analysen, sowie an Prof. Dr. Hansjörg Schild für die Bereitstellung des monoklonalen Antikörpers T-AG 25.D1-16.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Angelique Renzaho, Birgit Kühnapfel, Dorothea Gendig, Doris Thomas und Claudia Krause. Sie sind das Rückgrat unseres Instituts.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt und aufgemuntert haben.

Der letzte Dank geht an Jessica Kriewald. Sie kennt mich besser, als ich mich selbst, erträgt meine Launen und hat diese Arbeit tatsächlich gelesen.

Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekulare Quantifizierung der mCMV-Immunevasion“ am Institut für Virologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias J. Reddehase ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Wiesbaden, den 18.02.2009

Niels A. W. Lemmermann